



HAL
open science

Les cellules souches mésenchymateuses : cheval de Troie dans une thérapie gène suicide

Ikrame Amara

► **To cite this version:**

Ikrame Amara. Les cellules souches mésenchymateuses : cheval de Troie dans une thérapie gène suicide. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB155 . tel-04474771

HAL Id: tel-04474771

<https://theses.hal.science/tel-04474771>

Submitted on 23 Feb 2024

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

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

Université Paris Descartes
Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales

Ecole Doctorale « Médicament-Toxicologie-Chimie-Imageries »
ED MTCI n°563



THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Pharmacologie oncologique, Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Ikrame AMARA

Le 21 novembre 2016

**Les cellules souches mésenchymateuses :
Cheval de Troie dans une thérapie gène suicide**

JURY

M. le Docteur Nicolas FERRY
M. le Professeur Jean-Jacques LATAILLADE
Mme le Docteur Corinne TRANCHOT
M. le Professeur Marc SAPOVAL
M. le Docteur Laurent CORCOS
Mme le Docteur Isabelle de WAZIERS

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

“La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !”

Albert Einstein

ABBREVIATIONS.....	page I
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	page VI
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES.....	page X
AVANT-PROPOS.....	page 1
INTRODUCTION.....	page 3
I. Gene directed enzyme protein therapy.....	page 5
1- Principe.....	5
2- Les différentes combinaisons enzyme-pro-drogue.....	7
2.1 La Thymidine Kinase (TK) / Ganciclovir.....	7
2.2 La Cytosine Désaminase / 5-Fluorocytisine.....	9
2.3 La Nitroréductase / CB1954.....	11
2.4 La Désoxycytidine kinase / Gemcitabine.....	12
3- L'effet "bystander".....	14
II. Le Cytochrome 2B6/Cyclophosphamide (CPA).....	page 16
1- Les cytochromes P450.....	16
2- Le cytochrome P450 2B6.....	19
2.1 Métabolisme du cyclophosphamide.....	21
2.1.1 Pathologies traitées par le Cyclophosphamide.....	23
2.2 Construction du triple mutant : le CYP2B6 TM -RED.....	24
III. Le système immunitaire.....	page 27
1- Réponse immunitaire anti-tumorale.....	27
1.1 Les cellules NK (Natural Killer).....	27
1.2 Les lymphocytes T.....	28
1.2.1 Présentation de l'antigène.....	28
1.2.2 Les lymphocytes T effecteurs.....	32
a. Les lymphocytes Th CD4 ⁺	33
b. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺	36
2- Modulation des lymphocytes T par le cyclophosphamide.....	39
2.1 Déplétion des lymphocytes T régulateurs (Tregs).....	39
2.2 Amélioration de l'activité des lymphocytes T effecteurs : CD4 ⁺ et CD8 ⁺	42
.....	42
3- La mort immunogénique.....	44
3.1 Les signaux caractéristiques de la mort immunogénique.....	46
3.1.1 La translocation de la calréticuline.....	46
3.1.2 La sécrétion d'HMGB-1.....	48
3.1.3 La libération d'ATP.....	49
IV. Les vecteurs de transfert en thérapie génique.....	page 51
1- Vecteurs viraux.....	51

1.1 Les Adénovirus.....	52
1.2 Les Adeno-associated virus : AVV.....	54
1.3 Les Poxvirus: Virus : Virus de la vaccine.....	55
1.4 Les Rétrovirus.....	57
1.5 Les Lentivirus.....	58
2- Vecteurs non viraux.....	61
2.1 Les Liposomes.....	62
2.2 Les polymères cationiques.....	63
2.3 Les bactéries.....	65
3- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) : les nouveaux vecteurs appliqués en thérapie gène suicide.....	67
3.1 Les cellules souches.....	67
3.1.1 Les cellules souches embryonnaires (ES).....	69
3.1.2 Les cellules souches adultes.....	70
3.1.3 Les “Induced-pluripotent stem (iPS) cells”	72
3.2 Les cellules souches mésenchymateuses (MSC).....	73
V. Thérapie gène suicide utilisant les cellules souches mésenchymateuses (MSC).....	page 78
Revue biochimie Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors.....	78
VI. Les Essais cliniques.....	page 79
1- La GDEPT en clinique.....	79
2- La thérapie génique utilisant les MSC en clinique.....	82
VII. Objectifs de la thèse.....	page 84
RESULTATS ET DISCUSSION.....	page 87
Article 1: Engineered mesenchymal stem cells as vectors in suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors.....	89
Article 2: Proof of concept of a gene directed enzyme prodrug therapy with an intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rabbit Vx2 tumor hepatic model.....	93
Résultats complémentaires : Importance relative de la réponse cytotoxique de la réponse immunitaire dans l’efficacité du traitement par les cellules souches mésenchymateuses exprimant le CYP2B6 TM -RED et par le CPA.....	97
Introduction.....	98
Matériels et méthodes.....	99
Résultats.....	106
1. Translocation de la calréticuline à la surface des cellules tumorales de poumons TC1.....	106
2. Induction de l’autophagie des TC1 par le CPA.....	108

3. Relargage d'HMGB-1 par les TC1 dans le milieu extracellulaire.....	111
4. Implication du système immunitaire <i>in vivo</i> dans la réponse au traitement par la thérapie gène suicide.....	112
Conclusion.....	116

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....page 119

1. Comment augmenter et étendre la toxicité cellulaire ?.....	121
2. Comment stimuler le système immunitaire ?.....	122
3. Quelle voie d'injection des MSCs est la plus efficace ?.....	125
4. Comment développer des MSCs humaines ? Greffe allogène ou autologue.....	126
5. Quels sont les différents aspects réglementaires à valider avant tout essai clinique chez l'Homme ?.....	127
6. Quelles sont les alternatives possibles pour notre stratégie gène suicide ?.....	129

BIBLIOGRAPHIE.....page 131

ABBREVIATIONS

M4-OH-CPA : 4-hydroxy-cyclophosphamide

5-FC : 5-FluoroCytosine

5-FU : 5-FluoroUracile

5-FUMP : 5- FluoroUracile Monophosphate

AAV : Adeno-associated virus

ADH : Alcool déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléotide

Ahr : Arylhydrocarbon receptor

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN : Acide ribonucléotide

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain

ATG3 : Autophagy related 3

ATG5 : Autophagy related 5

ATP : Adénosine triphosphate

BCR : B Cells Receptor

BSA : Bovine Serum Albumine

CAR : Constitutive Androstane Receptor

CAR-T : Chimeric Antigene Receptor

CD : Cytosine désaminase

CD4 : Cluster de Différenciation 4

CD8 : Cluster de Différenciation 8

CD166 : Cluster de Différenciation 166

CDA : Cytidine désaminase

CépiDc : Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : CytoMégaloVirus

CPA : Cyclophosphamide

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CPI : 4-(4-chlorophenyl) imidazole
CRO : Contract Research Organization
CRT : Calréticuline
CYP: Cytochromes P450
CYP2B6: Cytochrome P450 2B6
CXCL12: Chimiokine (C-X-C motif) ligand 12
DAMPs: Damage Associated Molecular Patterns
DCK: Désoxycytidine kinase
DCTD: Desoxycytidine Triphosphate Désaminase
DL50 : Dose létale 50
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
dFdC : 2',2'-difluorodeoxycyridine (Gemcitabine)
dFdC-DP: Gemcitabine Diphosphate
dFdC-TP: Gemcitabine Triphosphate
DICS-X : Déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X
DOTMA : N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride
E1A : Gène précoce 1A
eIF2 α : Facteur d'initiation eucaryote 2 α
E1F α : Elongation Factor (EF)-1 α
ECL : Enhanced Chemiluminescent
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA : European Medicines Agency
ERp57: Endoplasmic Reticulum Protein 57
ES : Embryonic Stem cell (Cellules souches embryonnaires)
FasL : Ligand Fas
F-CFU: Fibroblast-Colony Forming Units
FCU1 : Gène de fusion codant la Cytosine désaminase :: Uracile Phosphoribosyltransférase
FoxP3: Forkhead box P3
GDEPT: Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy
GITR: Glucocorticoid-Induced Tumor necrotic factor receptor-Related
GMP : Good Manufacturing Practices

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
GSH : Glutathion réduit
GST : Glutathion S-transférase
GVHD: Graft-Versus-Host Disease
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HCC : Hépato-carcinome cellulaire
HGF: Hepatocyte growth factor
HLA-G: Human Leukocyte Antigen G
HMGB-1: High Mobility Group Box-1
HRP : Horseradish Peroxydase
HSC: Hematopoietic Stem Cell (Cellules souches hématopoïétiques)
HSV-TK/GCV: Herpès simplex virus thymidine kinase/Ganciclovir
IC₅₀: half maximal Inhibitory Concentration (Concentration Inhibitrice médiane)
Ig : Immunoglobuline
IL-2 : Interleukine-2
IL-12 : Interleukine-12
ITR : Inverted terminal repeats
INF- γ : Interféron γ (IFN- γ)
IPS : Induced Pluripotent Stem cells (Cellules souches pluripotentes induites)
IRM : Imagerie de résonance magnétique
Klf4 : Kruppel-like factor 4
LC3 : microtubule-associated protein Light Chain 3
LTR : Long Terminal Repeats
MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1
MMP2: Matrix MetalloProteinase-2
MP : Monophosphate
MT1-MMP: Membrane Type 1-Matrix MetalloProteinase 1
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MVA: Modified Vaccina Ankara
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NGS : Normal Goat Serum

NK : Neutral Killers

NSC : Neuronal Stem Cells (Cellules souches neuronales)

NYVAC: New York VACcinia

NLRP3: NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3

NO: monoxyde d'azote

NTR: Nitroréductase

OCT4: OCTamer-binding Transcription factor 4

P2RX7 : Purinergic receptors

PBS : Phosphate buffer Saline

PD1 : Programmed cell death 1

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PEG : Polyéthylène glycol

PEI : Polyéthylénimine

PERK: Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PLL: Poly(L-lysine)

POU : Acronyme de Pit-1 Oct-1 Unc-86

PRR: Pattern Recognition Receptors

PS : Phosphatidylsérine

PVDF : Polyvinylidène difluorique

PXR : Pregnane X receptor

RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RED : NADPH Cytochrome P450 réductase

RR : Ribonucléotide réductase

RSV : Rous Sarcoma Virus

RT : Reverse transcriptase

SDF-1: Stromal cell-Derived Factor 1

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SNP: Single nucleotide Polymorphisms

SNAP 25: Synaptosomal-Associated Protein 25

SOX : SRY-related HMG-box

SSEA-1 : Stage-Specific Embryonic Antigen 1

SVF : Sérum de veau foetal
TBP : TATA-Binding Protein
Tc : Lymphocytes T CD8+
Tc1 : lymphocytes T CD8+ cytotoxiques de type 1
TC1 : Tissu Culture number ne
TMB : 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine
TGF β : Tumor Growth Factor Beta
Th: Lymphocyte T Helper
Th0: lymphocyte T progéniteur
Th1: Lymphocytes de type 1 T helper
Thy1: Thymocyte antigen 1
TLR: Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha
TP : Triphosphate
Tregs : Lymphocytes T régulatrices
UMK : Uridine Monophosphate Kinase
UPRT : Uracile Phosphoribosyltransférase bactérienne
VAMP1 : Vesicle Associated Membrane Protein 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIB : Virus de l'immunodéficience bovine
VIE : Virus de l'immunodéficience équine
VIF : Virus de l'immunodéficience féline
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VIS : Virus de l'immunodéficience simienne
VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : La stratégie GDEPT.....	5
Figure 2 : Mécanisme d'action du Ganciclovir.....	8
Figure 3 : Métabolisme de la 5-Fluorocytosine (5-FC).....	10
Figure 4 : Activation de CB1954 par la mitroréductase bactérienne.....	12
Figure 5 : Métabolisation de la Gemcitabine.....	13
Figure 6 : Cycle d'activation du dioxygène et de l'oxydation des substrats par le cytochrome P450.....	18
Figure 7 : Métabolisation du Cyclophosphamide (CPA).....	22
Figure 8 : Présentation de l'antigène.....	29
Figure 9 : Activation des lymphocytes T.....	31
Figure 10 : Différenciation des lymphocytes T helper.....	34
Figure 11 : Cinétique de la différenciation des lymphocytes T CD8+ après une infection virale.....	37
Figure 12 : Mécanisme d'action des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques après une infection virale.....	38
Figure 13 : Les puissants effets immunomodulateurs du cyclophosphamide.....	40
Figure 14 : Libération des signaux immunogènes.....	45
Figure 15 : Exposition de la calréticuline.....	47
Figure 16 : Relargage d'HMGB1.....	48

Figure 17 : Libération d'ATP.....	50
Figure 18 : Répartition des vecteurs utilisés en essais cliniques pour la thérapie génique.....	51
Figure 19 : Représentation schématique du vecteur Lentiviral.....	60
Figure 20 : Vecteurs lipidiques.....	62
Figure 21 : Structure moléculaire de la poly(L-lysine) (PLL) et de la poly(éthylèneimine)(PEI).....	65
Figure 22 : Ciblage tumoral par des vecteurs bactériens.....	66
Figure 23 : Classification des cellules souches.....	68
Figure 24 : Le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses	74
Figure 25 : Propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses	76
Figure 26 : Utilisation des cellules souches mésenchymateuses CSMs comme vecteur de gène suicide	77
Figure 27 : Protocole explicatif du traitement des TC1.....	100
Figure 28 : Exposition de la Calréticuline (CRT) dans la mort immunogène.....	107
Figure 29 : Exposition de l'ERp57 dans la mort immunogène.....	108
Figure 30 : Expression de l'ARNm de LC3 dans les cellules tumorales TC1 exposées au surnageant des MSCs, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.....	109
Figure 31 : Expression de l'ARNm de LC3 dans les cellules tumorales TC1 exposées pendant 24h au surnageant des MSCs, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.....	110
Figure 32 : Expression de la forme II de la protéine LC3 dans les cellules tumorales	

TC1 exposées pendant 24h au surnageant des MSCs, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.....	111
Figure 33 : Dosage de la protéine HMGB1 (µg/mL) dans le surnageant de culture des cellules tumorales TC1 exposées pendant 48h au surnageant des MSCs, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.....	112
Figure 34 : Effet du CPA sur des souris xénotransplantées avec des cellules TC1-Luc2 avec du CPA et traitées ou non par des anticorps anti-CD8.....	114
Figure 35 : Effet du CPA sur des souris xénotransplantées avec des cellules TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED avec du CPA et traitées ou non par des anticorps anti-CD8.....	115
Figure 36 : Implication du système immunitaire dans notre thérapie gène suicide CYP2B6TM-RED couplé au cyclophosphamide (CPA) et transférer par les cellules souches mésenchymateuses (MSC).....	118
Figure 37 : Structure de la mitomycine C.....	122
Figure 38 : Mécanisme d'activation de la Tyrapazamine.....	122
Figure 39 : Action des immunothérapies anti-PD1 et anti-PD-L1.....	124

Tableau 1 : Etudes précliniques et cliniques sur l'effet du cyclophosphamide sur les lymphocytes T CD4⁺	42
Tableau 2 : Avantages, inconvénients et amélioration apportées des vecteurs adénoviraux.....	53
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des vecteurs AAV.....	55
Tableau 4 : Avantages et inconvénients des vecteurs issus des poxvirus.....	56
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des vecteurs rétroviraux.....	58
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des vecteurs lentiviraux.....	61
Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques des cellules souches.....	73
Tableau 8 : Résumé des principaux essais cliniques utilisant le système Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)/Ganciclovir.....	80
Tableau 9 : Les principaux essais cliniques utilisant soit la Cytosine désaminase/5-FC, soit la Nitroréductase/CB1954 ou la Désoxycytosine kinase/Gemcitabine.....	82
Tableau 10 : Les principaux essais cliniques utilisant la thérapie génique à base CSM.....	83
Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	101

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales à comité de lecture (relative à ce travail) :

Amara I, Touati W, Beaune P, de Waziers I, Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors, Biochimie, 105 (2014) 4-11.

Amara I, Pramil E, Senamaud-Beaufort C, Devillers A, Macedo R, Lescaille G, Seguin J, Tartour E, Lemoine F, Beaune P, and de Waziers I. (2016). Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors. J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.

Pellerin O* ; **Amara I*** ; Sapoval M; Méachi T; Déan C; Beaune P; de Waziers I. **Proof of concept of a gene directed enzyme prodrug therapy with an intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rabbit Vx2 tumor hepatic model. Manuscrit soumis à Radiology**

* *Co-first authors*

Communications orales :

Amara I, Pramil E, Senamaud-Beaufort C, Devillers A, Macedo R, Lescaille G, Seguin J, Tartour E, Lemoine F, Beaune P, and de Waziers I.(2016). Développement d'une stratégie de gène suicide dans le traitement du cancer. Data club de l'unité INSERM 1147, Paris, France, 29 janvier 2014, 27 janvier 2015, 20 octobre 2015 et 28 juin 2016.

Amara I, Pramil E, Senamaud-Beaufort C, Devillers A, Macedo R, Lescaille G, Seguin J, Tartour E, Lemoine F, Beaune P, and de Waziers I. (2016). Mis en évidence des mécanismes de mort immunogénique dans notre thérapie gène suicide. Journée scientifique du laboratoire INSERM 1147, Etampes, France, 24 septembre 2015.

Communications affichées :

Amara I, Touati W, Senamaud-Beaufort C, Moreau T, Seguin J, Beaune P, Lemoine F and de Waziers I. **Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for suicide gene therapy against tumors: in vitro and in vivo experiments.** XIII Annual Congress of the French Society of Cell and Gene Therapy, Toulouse, France, 24-26 mars 2014.

Amara I, Touati W, Senamaud-Beaufort C, Moreau T, Seguin J, Beaune P, Lemoine F and de Waziers I. **Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for suicide gene therapy against tumors: in vitro and in vivo experiments.** Journée Scientifique de CICB-Paris, Paris, France, 12 septembre 2014.

Amara I, Touati W, Senamaud-Beaufort C, Moreau T, Seguin J, Beaune P, Lemoine F and de Waziers I. **Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for suicide gene therapy against tumors: in vitro and in vivo experiments.** Les journées scientifiques de l'Ecole Doctorale MTCl, Villetaneuse, France, 23-24 juin 2015.

Amara I, Pramil E, Senamaud-Beaufort C, Devillers A, Seguin J, Beaune P, Lemoine F, and de Waziers I. **Sensitization of tumor cells by gene therapy with cyclophosphamide.** 4th International Conference on Translational Medicine, Baltimore, USA, 26-28 octobre 2015.

Amara I, Pramil E, Senamaud-Beaufort C, Devillers A, Macedo R, Lescaille G, Seguin J, Tartour E, Lemoine F, Beaune P, and de Waziers I. **Engineered mesenchymal stem cells are effective in a suicide gene therapy against pulmonary cancer.** XXIV Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) and the International Society for Stem Cell Research, Florence, Italy, 18-21 octobre 2016.

Pellerin O* ; **Amara I*** ; Sapoval M; Méachi T; Déan C; Beaune P; de Waziers I. **Proof of concept of a gene directed enzyme prodrug therapy with an intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rabbit Vx2 tumor hepatic model.** XXIV Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) and the International Society for Stem Cell Research, Florence, Italy, 18-21 octobre 2016.

AVANT-PROPOS

Les cancers constituent la première cause de mortalité chez l'Homme représentant près de 30% des cas de décès en France (*Inserm-CépiDc*). Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont le cancer de la prostate, puis du colon-rectum et du poumon. Chez la femme, nous retrouvons ce dernier en troisième position après le cancer du sein et le cancer colorectal. Le nombre de nouveaux cas décelés était de **385 000** en 2015 (*Institut National du Cancer INCA*) <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/Incidence-mortalite-nationale> , chiffre en progression depuis près de 30 ans. Néanmoins, il est à relativiser puisqu'il est associé à une diminution de la mortalité ainsi qu'à une augmentation de l'espérance de vie après un cancer. Ce phénomène peut s'expliquer par une meilleure détection de certains cancers, donc une augmentation du nombre de cas diagnostiqués, ainsi que par les progrès thérapeutiques réalisés depuis ces 20 dernières années. La chirurgie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie sont les traitements « classiques » utilisés en première intention contre les cancers. Par ailleurs, de nouvelles thérapies ont émergé depuis quelques années, parmi lesquelles les thérapies ciblées et l'immunothérapie. Ces nouvelles thérapies ont amélioré l'efficacité et diminué la toxicité des traitements classiques. Cependant, des résistances et des effets secondaires à ces traitements apparaissent. Il est donc indispensable de développer de nouvelles thérapies afin de les atténuer et ainsi de permettre une meilleure qualité de vie des patients.

Parmi les stratégies innovantes en développement, la thérapie par gène « suicide » semble avoir un avenir prometteur. Cette thérapie consiste à faire exprimer une enzyme qui va être capable de métaboliser une pro-drogue non toxique en métabolites toxiques au sein

même de la tumeur, permettant ainsi de diminuer la toxicité au niveau de l'organisme entier. L'efficacité de cette stratégie a été démontrée dans de nombreuses études pré-cliniques, conduisant au développement d'essais cliniques qui se sont parfois révélés décevants. L'analyse de ces résultats a permis d'identifier les **paramètres « clés »** à optimiser pour obtenir des résultats thérapeutiques concluants.

Lors d'un premier travail de thèse réalisé par Walid Touati en 2013 (Touati et al., 2014a) le gène suicide a été optimisé, l'effet "by-stander" démontré et une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales observée.

Dans la poursuite de ce travail, mes travaux de thèse se sont focalisés dans un premier temps sur l'amélioration de l'administration d'un gène suicide « optimisé », le cytochrome P450 2B6, au sein des tumeurs par l'utilisation d'un nouveau vecteur : les cellules souches mésenchymateuses. Dans un second temps, j'ai étudié l'implication du système immunitaire dans la réponse au traitement par le gène suicide et la pro-drogue.

INTRODUCTION

I. “Gene directed enzyme protein therapy: GDEPT”

1. Principe :

Une stratégie émergente et très prometteuse dans le traitement des tumeurs solides est la « *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy* » (GDEPT). La GDEPT consiste à transférer au sein de la tumeur un gène codant pour une enzyme capable de métaboliser une pro-drogue, non toxique, en métabolites actifs thérapeutiques. Le concept de GDEPT existe depuis une trentaine d’années. Cependant, l’importance de l’approche GDEPT n’a commencé à émerger qu’au cours des 15 dernières années avec de plus en plus de systèmes de GDEPT entrant dans les essais cliniques ; on en dénombre actuellement environ 169. La GDEPT comprend habituellement un système à trois composants: un médicament inactif (la pro-drogue), un gène codant pour une enzyme qui convertit la pro-drogue inactive en un médicament actif, et un vecteur pour apporter le gène au niveau de la tumeur. Cette approche permet de combiner des stratégies de ciblage passifs ou actifs afin de maximiser l’activité anti-cancéreuse sur le site de la tumeur tout en minimisant l’impact sur les tissus sains situés aux alentours.



En respect du droit d’auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 1 : La stratégie GDEPT (Williams et al., 2015) (A) La livraison du gène (rectangle violet) se fait via un vecteur, (B) ceci conduit à l’expression spécifique dans la tumeur de l’enzyme codée (pacman violet), qui est capable de convertir une pro-drogue (carré rouge) en métabolite(s) cytotoxique(s). (C) La conversion de la pro-drogue en métabolites toxiques va conduire à des effets toxiques dans les cellules transfectées. (D) et les cellules voisines non-transfectées peuvent également être tuées en raison d’un effet de voisinage local appelé effet « "by-stander" ».

Par définition, la GDEPT est un procédé en deux étapes dans lequel le gène codant pour une enzyme choisie est apporté au sein de la tumeur suivi dans un second temps par l'administration d'une pro-drogue non toxique (Portsmouth et al., 2007a). La mort cellulaire se produit suite à la conversion de la pro-drogue en métabolite(s) toxique(s) par les cellules transduites qui expriment activement le gène suicide (**Figure 1**). Dans le contexte de la GDEPT, l'index thérapeutique augmente en réduisant les effets secondaires et en limitant la toxicité de la molécule anti-cancéreuse aux cellules tumorales cibles (Zhang et al., 2015). Cette approche présente deux avantages distincts par rapport aux stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses conventionnelles, telles que la chimiothérapie et la radiothérapie.

Le premier avantage est la possibilité de cibler l'emplacement où aura lieu la transcription du gène suicide. En effet, celui-ci est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la tumeur de sorte que l'expression génique se produise uniquement dans les cellules tumorales, et non pas dans les cellules saines (Conrad et al., 2011; Niess et al., 2011; Zischek et al., 2009). Par conséquent, la pro-drogue est activée uniquement dans l'environnement tumoral réduisant ainsi la probabilité d'observer des effets secondaires. Le second avantage est que le gène suicide est transféré à l'aide de vecteurs (viraux ou non-viraux) au sein des tumeurs.

Le succès de la GDEPT est fortement dépendant de l'effet "by-stander" qui est défini comme l'extension de la toxicité du médicament à partir des cellules transduites aux cellules non-transduites avoisinantes. Contrairement à d'autres approches de thérapie génique, où seules les cellules qui reçoivent le gène thérapeutique subissent une apoptose ou une nécrose, l'effet thérapeutique dans la GDEPT peut se propager à partir de cellules transduites aux cellules voisines. Les métabolites actifs, issus de la pro-drogue transformée, peuvent, selon leur taille et leur composition chimique, diffuser au sein de la tumeur et expliquer qu'une éradication complète de la tumeur puisse être observée avec un pourcentage de cellules tumorales transduites par le gène suicide de moins de 10% seulement (Ardiani et al., 2012a)(Huber et al., 1994a).

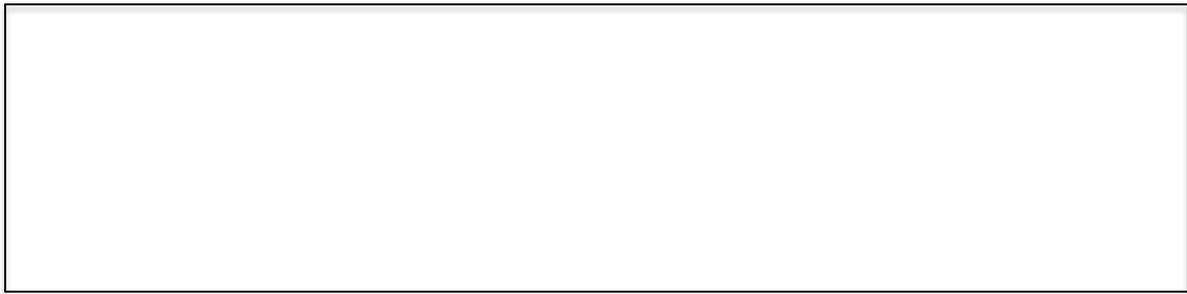
Un autre genre d'effet "by-stander", nommé généralement « distant by-stander effect » pour effet "by-stander" à distance, correspond à l'activation de la réponse immunitaire (Engelmann et al., 2002). Ce phénomène a été observé lorsque les cellules CD4

+, CD8 + ainsi que les cellules Neutral Killers (NK) sont attirées dans le site de la tumeur primaire. Ceci est suivi d'une réponse immunitaire systémique aux niveaux des sites métastatiques, qui sont anatomiquement bien loin de la tumeur primaire traitée par le gène suicide (Kuriyama et al., 2004a) (Pierrefite-Carle et al., 2002). Il est connu que la mort des cellules tumorales entraîne la libération d'antigènes qui sont les stimulateurs d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Aguilar et al., 2011a). En général, la GDEPT offre cette possibilité de tuer efficacement plus de cellules cancéreuses, tout en limitant de manière significative la toxicité en dehors du tissu tumoral. De plus, elle constitue une stratégie qui reste relativement peu affectée par l'hétérogénéité tumorale.

2. Les différentes combinaisons enzyme / pro-drogue :

2.1 La Thymidine Kinase (TK) / Ganciclovir

L'Herpès simplex virus thymidine kinase / Ganciclovir (HSV-TK/GCV) est le système enzyme/pro-drogue le plus utilisé dans les études pré-cliniques et cliniques de thérapie génique contre le cancer. L'expression du gène HSV-TK conduit à la synthèse de la thymidine kinase virale qui convertit le Ganciclovir (GCV), un analogue de la guanosine, en GCV monophosphate. Ce dernier va, à son tour, être transformé en métabolite toxique, GCV-triphosphate, par les kinases cellulaires endogènes (**Figure 2**). Les TK cytosoliques présentes dans les cellules ont une affinité nettement moins forte pour le GCV que l'HSV-TK (1000 fois moins), ainsi la première phosphorylation de GCV en GCV monophosphate est forcément réalisée par la TK virale (Gallois-Montbrun et al., 2004). Le GCV-triphosphate va lui se comporter comme un analogue nucléosidique et s'incorporer au niveau de l'ADN lors de l'étape de réplication et conduire à l'inhibition de l'ADN polymérase, l'arrêt de la réplication et à l'entrée en apoptose (Balzarini et al., 1993). Ainsi, l'HSV-TK couplée au GCV conduit à la destruction des cellules tumorales *via* des mécanismes induisant l'apoptose (Beltinger et al., 1999).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 2 : Mécanisme d'action du Ganciclovir (Karjoo et al., 2016). HSV-TK phosphoryle la thymidine en thymidine monophosphate (thymidine-MP) qui va par la suite subir plusieurs étapes de phosphorylation par des kinases cellulaires endogènes. Le produit final, la thymidine triphosphate (thymidine-TP) est l'un des éléments constitutifs de la structure de l'ADN. Le Ganciclovir est un analogue de la thymidine. De même, il va être phosphorylé par HSV-TK et former dans un premier temps le ganciclovir-MP pour enfin donner la forme triphosphate ganciclovir-TP. Ce ganciclovir-TP va bloquer l'élongation de l'ADN en inhibant l'ADN polymérase.

L'activité anti-tumorale d'HSV-TK/GCV a été démontrée *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs modèles pré-cliniques de cancers. Parmi ces cancers, on retrouve : le gliome (Barzon et al., 2009), la leucémie (Blumenthal et al., 2007; Bondanza et al., 2011), le cancer de la vessie (Pan et al., 2012), le cancer du foie (Kakinoki et al., 2010) et le cancer des ovaires (Wang et al., 2011). Les résultats encourageants observés lors de ces études pré-cliniques ont facilité le transfert en clinique de cette stratégie.

Néanmoins, les effets observés chez l'Homme ont mis en avant des problèmes limitant l'action et donc l'efficacité de la thérapie. Deux grands obstacles ressortent : le premier est le faible effet "by-stander" du fait que le métabolite toxique, GCV-triphosphate, nécessite la présence de jonctions communicantes (« gap junctions ») pour pouvoir diffuser à travers les cellules tumorales, or celles-ci sont très diminuées en nombre voire ne sont plus fonctionnelles dans de nombreuses tumeurs (Mesnil and Yamasaki, 2000; Nicholas et al., 2003). Le deuxième point vient du fait que la thymidine kinase de HSV possède une affinité 100 fois plus importante pour la thymidine que pour le ganciclovir. Cette compétition avec un substrat endogène représente une limite importante car le ganciclovir doit alors être utilisé à une concentration relativement élevée conduisant ainsi à des effets secondaires néfastes telles que la déplétion des cellules immunitaires et une perte d'efficacité de la

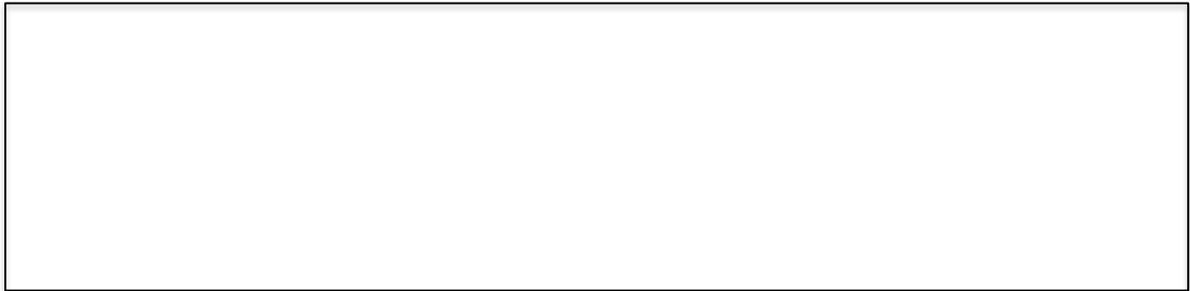
stratégie (Ardiani et al., 2012b; Dachs et al., 2009).

Dans le but d'augmenter l'affinité d'HSV-TK pour GCV, certains laboratoires ont réalisé des mutations au niveau du site actif de l'enzyme. Ces mutations ont eu pour effet d'améliorer l'effet "by-stander" (Ardiani et al., 2010; Preuss et al., 2011) et aussi d'augmenter l'affinité pour le Ganciclovir (300 fois plus) (Black et al., 2001). D'autres ont pré-traité les tumeurs avec des protéases (trypsine ou un mix de collagénase/dispase) en intra-tumoral afin d'améliorer la diffusion des métabolites actifs et par conséquent l'effet "by-stander" (Kuriyama et al., 2001). Ce pré-traitement a permis d'améliorer l'efficacité du traitement médié par l'adénovirus recombinant l'HSV-TK couplé au GCV.

2.2 La Cytosine Désaminase / 5-Fluorocytosine

La Cytosine Désaminase (CD) est une enzyme présente essentiellement dans les bactéries (*Escherichia Coli*), les champignons (*Aspergillus Fumigatus*) et les levures (*Saccharomyces Cerevisiae*). Elle n'est pas présente dans les cellules de mammifères. Cette enzyme permet la désamination d'une cytosine en uracile. Le 5-Fluoro-Uracile (5-FU), un analogue nucléotidique des bases pyrimidiques, est très souvent utilisée dans les chimiothérapies pour traiter les adénocarcinomes digestifs et mammaires, cependant, les patients ne toléraient pas les fortes doses (toxicités cardiaque et hématologique) nécessaires pour observer une activité anti-cancéreuse (Köhne et al., 1998; Papanastasopoulos and Stebbing, 2014). La 5-Fluoro-Cytosine (5-FC), quant à elle, est un précurseur du 5-FU converti par la CD. En effet, la conversion du 5-FC en 5-FU aura lieu uniquement au sein des cellules exprimant la CD, celle-ci n'existant pas chez les mammifères, évitant ainsi toute toxicité systémique (Miller et al., 2002). Une fois le 5-FU formé, celui-ci va être pris en charge par des enzymes intracellulaires qui vont le transformer tout d'abord en 5-FU monophosphate (5-FUMP) pour ensuite former le désoxy, 5-FdUMP (**Figure 3**). Ce dernier va jouer le rôle d'anti-métabolite en se liant de façon irréversible à la thymidilate synthetase. Le 5-FUMP va également être transformé en 5-FU triphosphate (5-FUTP et 5-FdUTP) provoquant l'arrêt de la synthèse d'ADN et d'ARN qui va entraîner la mort de la cellule par apoptose (Agard et al., 2001; Aguilar et al., 2011b). L'atout majeur de ce système CD / 5-FC par rapport à l'HSV-TK / GCV est qu'il possède un effet "by-stander" important et indépendant des jonctions communicantes étant donné que la 5-FU peut

circuler librement à travers les cellules (Huber et al., 1994b). De plus, ce système présente un puissant effet “by-stander” à distance impliquant l’activation d’une réponse immunitaire (Ostertag et al., 2012).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 3 : Métabolisme de la 5-Fluoro-Cytosine (5-FC) (Karjoo et al., 2016). La 5-FC va être désaminée par la cytosine désaminase (CD). Son produit, la 5-FU, va être convertie en 5-FU monophosphate (5-FUMP). Cette dernière va être transformée en 5-FU triphosphate (5-FUTP) et bloquer la synthèse d’ARN. Cependant, il peut également être réduit pour donner la 5-FdUMP qui va inhiber la thymidilate synthase (ou synthétase) et la 5-FdUTP va bloquer ainsi la synthèse d’ADN après son incorporation dans la structure d’ADN.

Un des inconvénients du système CD / 5-FC, est que la 5-FC peut être convertie en 5-FU par la cytosine désaminase présente dans les bactéries intestinales pouvant ainsi entraîner des complications dans le tractus gastro-intestinal chez 6% des patients traités (Benson and Nahata, 1988). 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 anti-tumoral provoquant de graves toxicités dans la moelle osseuse et donc des effets hématologiques indésirables (Karjoo et al., 2016).

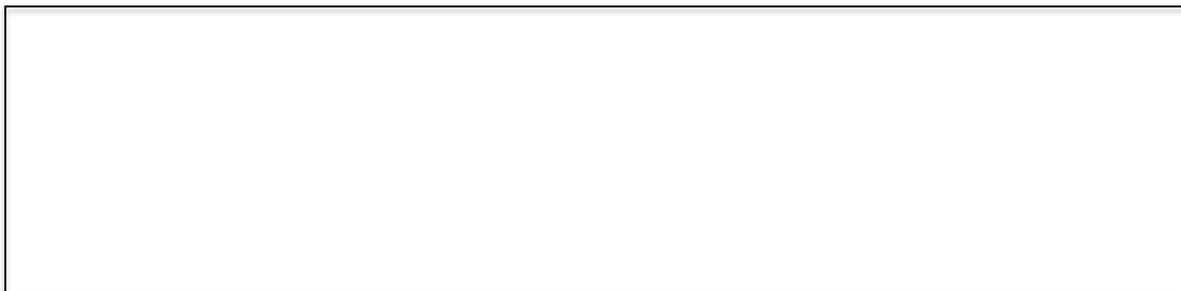
Des mutations de la Cytosine Désaminase ont été faites dans le but d’améliorer ses paramètres cinétiques. Elles ont eu pour effet d’augmenter son affinité pour le 5-FC (jusqu’à 30 fois plus) et de diminuer son IC₅₀ (Deng et al., 2011; Fuchita et al., 2009; Kaliberova et al., 2008). L’utilisation de la Cytosine Désaminase de la levure pourrait également être une solution aux effets secondaires observés dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la fusion de la CD de levure avec l’Uracile Phosphoribosyltransférase bactérienne (UPRT) possède une

meilleure affinité au 5-FC par rapport à l'enzyme CD seule (Richard et al., 2007; Shi et al., 2009).

2.3 La Nitroréductase / CB1954

CB1954 est une pro-drogue qui va se transformer en métabolites toxiques (2-hydroxylamine et 4-hydroxylamine) avec l'aide de la nitroréductase (NTR) issue d'*Escherichia coli* (Greco and Dachs, 2001). Par la suite, la réduction de ces molécules par les thioestérases intracellulaires conduit à la formation de puissants agents alkylants de l'ADN capables de diffuser librement à travers les cellules et d'entraîner leur mort (**Figure 4**). Les métabolites de CB1954 ont l'avantage d'induire la mort des cellules indépendamment de leur cycle. L'efficacité de ce système Nitroréductase / CB1954 a été démontrée dans quelques essais cliniques, notamment dans le traitement du cancer du foie (Langford et al., 2009) et de la prostate (van Putten et al., 2010).

Malgré son efficacité en partie due à un effet "by-stander" important, un problème persiste celui de l'immunogénicité de la nitroréductase bactérienne qui reste un inconvénient majeur à surmonter (Xu et al., 2009).

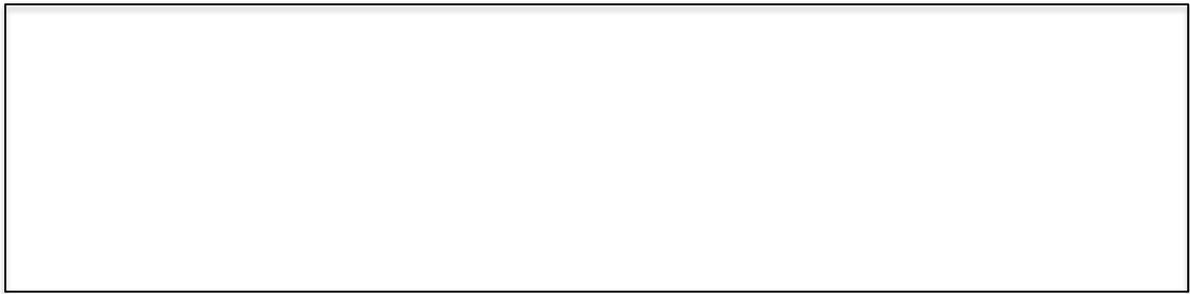


En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 4 : *Activation de CB1954 par la nitroréductase bactérienne (Karjoo et al., 2016). Le CB1954 va être métabolisé par la nitroréductase et va conduire à la formation de deux métabolites, le 2-Hydroxylamine et le 4-Hydroxylamine. Tous deux vont être transformés en puissants agents alkylants par les thioestérases cellulaires et vont endommager l'ADN.*

2.4 Désoxycytidine kinase / Gemcitabine

La gemcitabine (dFdC, 2',2'-difluorodeoxycyridine) est un analogue nucléosidique de la désoxycytidine qui a un effet sur plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN (Plunkett et al., 1995). Comme d'autres analogues nucléosidiques, la gemcitabine est une pro-drogue nécessitant une activation par des phosphorylations successives réalisées par différentes kinases intracellulaires qui conduisent à la formation de gemcitabine triphosphate (dFdC-TP) active (**Figure 5**). Celle-ci va s'incorporer dans l'ADN bloquant ainsi son élongation lors de la réplication. La gemcitabine peut aussi s'incorporer dans l'ARN (Ruiz van Haperen et al., 1993) et induire l'apoptose des cellules (Bouffard and Momparler, 1995; Gruber et al., 1996; Huang and Plunkett, 1992).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 5 : Métabolisation de la gemcitabine (Rudin et al., 2011).

La gemcitabine (dFdC) est activée en gemcitabine triphosphate (dFdC-TP) par une cascade de phosphorylations impliquant en premier lieu la désoxycytidine kinase (DCK) qui donnera la gemcitabine monophosphate (dFdC-MP). Des kinases cellulaires interviendront ensuite pour phosphoryler de nouveau la gemcitabine aboutissant à la gemcitabine triphosphate (dFdC-TP), 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 (CDA) ou bien par la desoxycytidine triphosphate désaminase (DCTD). La gemcitabine diphosphate (dFdC-DP) peut être aussi réduit pour former un analogue nucléosidique de l'ADN par la ribonucléotide réductase (RR).

Parmi les protéines kinases conduisant à la synthèse de la forme active de la gemcitabine, la Désoxycytidine kinase (DCK) est une enzyme humaine impliquée dans la phosphorylation des désoxycytidines, dont la gemcitabine. La DCK a une meilleure affinité pour son substrat endogène la désoxycytidine que pour la gemcitabine (Km trois fois plus faible) (Bouffard et al., 1993). La DCK va intervenir en premier dans la cascade de phosphorylation de la gemcitabine, permettant d'obtenir un composé monophosphate (dFdC-MP), puis des kinases intracellulaires vont phosphoryler ce dernier jusqu'à obtenir la forme triphosphate (dFdC-TP). 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 pro-drogue, la DCK est associée dans un gène de fusion avec l'Uridine Monophosphate Kinase (UMK) qui intervient lors de la deuxième 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 (Vernejoul et al., 2006). La combinaison de la gemcitabine avec d'autres agents anti-cancéreux, tels que le cisplatine (Mosconi et al., 1997) ou bien les taxanes (Tester and Mora, 2001) a montré une

amélioration de l'activité anti-tumorale. Néanmoins, ce système DCK/gemcitabine présente le même problème que HSV-TK / GCV : son effet "by-stander" est médié par les jonctions communicantes car les métabolites actifs formés sont des nucléosides phosphorylés (Cottin et al., 2010).

3. L'effet "by-stander"

L'efficacité du transfert de gène est en général de l'ordre de moins de 10% dans les tissus cibles dans le cas de vecteurs viraux qui sont pourtant les plus efficaces (Zhang et al., 2015). De ce fait, l'effet "by-stander" est primordial pour la GDEPT afin d'arriver avec succès à une régression tumorale. L'effet "by-stander" a été mis en évidence pour la première fois par Moolten en 1986 (Moolten, 1986). Il est décrit comme une extension de la mortalité causée par une molécule activée par les cellules transduites jusqu'aux cellules non transduites avoisinantes (Dachs et al., 2009; Freeman et al., 1993; Huber et al., 1994b). Ainsi, l'effet "by-stander" peut amplifier l'efficacité du traitement.

Le transfert des métabolites toxiques, dans le cas de l'effet "by-stander" local, peut être fait à travers les jonctions communicantes (Touraine et al., 1998), *via* des vésicules apoptotiques (Freeman et al., 1993) ou bien par diffusion passive de métabolites solubles (Greco et al., 2000; Stribbling et al., 2000).

Dans le cas de la diffusion à travers les jonctions communicantes, l'effet "by-stander" est restreint. En effet, les jonctions communicantes sont diminuées voir inexistantes dans la majorité des tumeurs (Yamasaki, 1991). Ceci constitue la principale limitation du système HSV-TK / Ganciclovir dont le métabolite actif formé est un nucléoside triphosphate (GCV-TP) chargé qui ne peut donc pas diffuser à travers les membranes cellulaires.

Dans le cas d'une diffusion indépendante des jonctions communicantes, le facteur qui limite l'efficacité de l'effet "by-stander" est la demi-vie des métabolites actifs (Patterson and Harris, 1999). Le système Cytosine désaminase / 5-FC présente un puissant effet "by-stander" local car son métabolite diffuse de manière non facilitée *via* des transporteurs. Des études *in vitro* ont montré que 1 à 30 % de cellules transduites par le gène suffisent pour générer le 5-FU et induire l'inhibition de croissance des cellules avoisinantes non transduites (Domin et al., 1993; Huber et al., 1994b).

L'effet "by-stander" peut aussi être induit par le contact direct avec les cellules mortes ou en train de mourir, due au relargage de facteurs apoptotiques (Frank et al., 1998; Freeman et al., 1993).

Par ailleurs, un autre facteur important, en plus de l'effet "by-stander", est impliqué dans la régression tumorale il s'agit du développement d'une réponse immunitaire. Cette dernière, appelé aussi effet "by-stander" à distance, est quant à elle observée *in vivo* et consiste en la régression de métastases situées à distance de la tumeur primaire contenant en partie les cellules transduites (Duarte et al., 2012).

Des expériences sur des modèles animaux montrent qu'une réponse immunitaire systémique peut jouer un rôle essentiel dans l'effet "by-stander" (Freeman et al., 1997). En effet, il a été observé que ce dernier est significativement réduit chez des souris immunodéficientes (Gagandeep et al., 1996; Kuriyama et al., 1999; Pavlovic et al., 1996). Le système immunitaire n'augmente pas seulement l'effet local, mais il peut aussi induire la régression de métastases situées à distance de la tumeur primaire (Dilber and Smith, 1997).

L'effet "by-stander" a un très grand rôle dans la réussite des thérapies gène suicide. Ainsi, de nombreuses études se sont focalisées sur l'amélioration de l'effet "by-stander" local ou distant. Par exemple, l'expression de gènes codants pour les connexines dans les cellules tumorales permet d'augmenter la communication intercellulaire *via* les jonctions communicantes et ainsi d'améliorer le transfert du GCV-TP (Andrade-Rozental et al., 2000; Touraine et al., 1998). Un autre moyen d'améliorer l'effet "by-stander" est d'associer aux enzymes de la GDEPT des immunomodulateurs tels que IL-2, IL-12, INF- γ et le TNF- α (Portsmouth et al., 2007b). Une étude sur des souris atteintes d'érythroleucémies et traitées par l'association de la cytosine désamine / 5-FC avec l'interleukine-2 (IL-2) de souris a montré une inhibition de la croissance tumorale plus importante et un prolongement de la survie par rapport aux traitements donnés séparément (Ju et al., 1998).

II. Le Cytochrome 2B6/Cyclophosphamide (CPA)

1. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) ont été découverts en 1958 par Klingenberg (Klingenberg, 1958) (Omura and Sato, 1962). Ils interviennent dans un certain nombre de réactions impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques : médicaments et agents cancérigènes. En effet, les cytochromes P450 jouent un rôle dans 75% des réactions enzymatiques qui se produisent lors du métabolisme des médicaments (Rendic and Guengerich, 2015; Williams et al., 2004). Par ailleurs, ils sont également impliqués dans le métabolisme des stéroïdes (Mueller and Miller, 1948).

Sur les 57 gènes de CYP présents chez l'Homme (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) (Nelson, 2009), cinq sont impliqués dans le métabolisme de 90% des petites molécules médicamenteuses (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4), avec une sélectivité variable (Rendic and Guengerich, 2015; Williams et al., 2004). A l'heure actuelle, il est possible de faire des essais *in vitro* pour établir quels CYPs (et d'autres enzymes) sont impliqués dans la clairance des nouveaux médicaments candidats et donc de prédire les paramètres pharmacocinétiques du médicament, les interactions médicamenteuses, ainsi que les questions liées aux variations inter-individuelles des patients et à la pharmacogénétique (Guengerich, 2015).

Les CYPs se localisent principalement dans le foie mais ils sont également présents dans les organes en contact avec l'environnement extérieur : poumon, intestin ou les organes ayant un important débit sanguin comme le rein.

Les CYPs participent à un système multi-enzymatique composé d'une mono-oxygénase (CYP) et d'une NADPH Cytochrome P450 réductase (RED). Ce système va notamment réaliser des mono-oxygénations sur les xénobiotiques avec principalement des hydroxylations et des époxydations (Mansuy, 2011). La réductase (RED) intervient, quant à elle, dans le transfert d'électrons qui est indispensable à l'activité des CYPs avec l'aide de son co-facteur, le NADPH fournisseur d'électrons. Ces réactions de mono-oxygénations ont lieu lors de la phase 1 dite « Phase de fonctionnalisation ». Lors de cette étape, les xénobiotiques vont se voir greffer principalement un groupement hydroxyle (-OH) par les CYP dans le but de les rendre plus hydrophiles et faciliter ainsi leur élimination de l'organisme.

Les CYPs sont des hémoprotéines associées à la membrane externe du réticulum endoplasmique. Ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique : l'apoprotéine, liée de

façon non-covalente par l'intermédiaire d'une cystéine, à un groupement prosthétique central : l'hème qui catalyse les réactions enzymatiques.

Le cycle catalytique des CYPs conduisant à l'ajout d'un groupement hydroxyle au substrat se déroule en plusieurs étapes (**Figure 6**). Dans un premier temps, il va y avoir réduction du fer de l'hème par transfert d'un électron apporté par la RED et la NADPH, permettant la fixation d'une molécule d'O₂ sur l'hème ferreux (Fe²⁺). Dans un deuxième temps, l'apport d'un second électron va conduire à la formation de l'hème ferrique (Fe³⁺) qui grâce à l'apport de protons va libérer une molécule d'eau. Enfin lors de la dernière étape, l'atome d'oxygène restant va ensuite être transféré au substrat permettant la formation du produit hydroxyle ou époxyde ainsi qu'un retour de l'hème à un état ferreux prêt à entamer un nouveau cycle de mono-oxygénation.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 6 : Cycle catalytique d'activation du dioxygène et de l'oxydation des substrats par le cytochrome P450 (Mansuy, 2011).

RH = substrat ; S = ligand cystéine de la protéine. Dans son état natif, le cytochrome P450 est sous forme d'un complexe Fe(III) hexacoordiné avec une molécule d'eau comme sixième ligand du Fer. La fixation du substrat sur la protéine conduit à un complexe du Fe(III) pentacoordiné plus facilement réductible par un électron venant de la P450 réductase. La fixation du dioxygène sur le P450Fe(II) et le transfert d'un électron et de deux protons conduit successivement aux espèces intermédiaires Fe(III)-OO-, Fe(III)-OOH, et (porphyrine radical-cation)Fe(IV)O. Le complexe Fer-oxo à haut degré d'oxydation est capable de transférer son atome d'oxygène à pratiquement n'importe quel substrat R-H avec formation de R-OH et du P450Fe(III).

Les CYPs sont regroupés en familles et sous-familles selon leur degré d'homologie de séquence en acides aminés (Nelson, 2006). La nomenclature se base sur un système de chiffres et de lettres. Le premier chiffre représente la famille, il est suivi d'une lettre spécifique à la sous-famille et enfin d'un chiffre qui indique l'isoforme.

Deux CYPs sont considérés de la même famille s'ils ont une similitude de séquence en acides aminés supérieure à 40%, et de la même sous-famille si leur similitude de séquence est supérieure à 55% (Nelson et al., 1993). L'expression des différentes familles et sous-familles varie dans chaque tissu.

Environ 500 acides aminés formant 16 à 18 hélices alpha et 4 à 6 feuilletts bêta constituent les CYPs. Les acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage de la protéine dans les membranes du réticulum endoplasmique sont situés dans la partie N-terminale. Ceux-ci sont suivis d'un motif conservé riche en proline constitué de résidus chargés positivement interagissant avec les têtes polaires des phospholipides membranaires (Johnson and Stout, 2013).

Le site actif des cytochromes P450 est formé par une cavité hydrophobe reliée à l'environnement extérieur par des canaux dans lesquels circulent les substrats, les produits des réactions et autres molécules indispensables à la réaction enzymatique.

Les CYPs métabolisent une grande variété de substrats. Un CYP peut métaboliser différentes molécules de poids moléculaires et de nature chimique différents. De plus, un même substrat peut être métabolisé par différents CYPs (Rendic and Carlo, 1997). Par exemple, le cyclophosphamide peut être métabolisé par les cytochromes P450 3A4 et 2B6 produisant des métabolites ayant des propriétés physico-chimiques différentes (Chang et al., 1993).

Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour les cytochromes P450 peut être modulée par des ligands endogènes ainsi que par un grand nombre de xénobiotiques *via* l'activation transcriptionnelle de récepteurs nucléaires tels que Ahr (Arylhydrocarbon receptor), PXR (Pregnane X receptor), CAR (Constitutive androstane receptor) ayant pour cible les promoteurs des CYPs (Smutny et al., 2013).

De plus, les cytochromes P450 sont impliqués dans l'activation d'un grand nombre de pro-drogues permettant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Kan et al., 2002).

2. Le cytochrome P450 2B6

Le CYP2B6 appartient aux CYPs cliniquement importants dans le métabolisme des médicaments. En effet, le CYP2B6 est la principale enzyme de bio-transformation pour un certain nombre de médicaments utilisés en clinique tels que la kétamine et le propofol (des anesthésiques) (Oda et al., 2001; Yanagihara et al., 2001), le bupropion (un anti-dépresseur) (Hesse et al., 2000), l'efavirenz (un anti-rétroviral) (Ward et al., 2003) et la méthadone (un analgésique) (Totah et al., 2008). De plus, il possède une grande variabilité d'expression due à l'existence de puissants inhibiteurs et inducteurs, ainsi qu'à de nombreux polymorphismes génétiques (Lang et al., 2001). Le CYP2B6 appartient comme son nom l'indique à la famille CYP2 et il est localisé sur le bras long du chromosome 19 (Hoffman et al., 2001). Le gène codant pour le CYP2B6 est conservé dans plusieurs espèces dont le chien, la souris et le rat, exprimant les orthologues du CYP2B6 qui sont respectivement le CYP2B11, le Cyp2b10 et le CYP2B1 (Nelson et al., 2004). Le CYP2B6 est principalement exprimé dans le foie où il représente entre 1% et 11% des CYPs hépatiques, avec une grande variabilité interindividuelle des niveaux de protéines de l'ordre de 100 fois (Gervot et al., 1999; Rostami-Hodjegan and Tucker, 2007). Cette grande variabilité est la conséquence de facteurs génétiques (polymorphismes) et non génétiques (inducteurs). En plus du foie, le CYP2B6 est aussi exprimé dans les reins, le cerveau, la peau et différentes régions des tractus gastro-intestinaux et respiratoires (Ding and Kaminsky, 2003; Gervot et al., 1999; Yengi et al., 2003). Les substrats du CYP2B6 sont généralement des molécules assez lipophiles, neutres ou faiblement basiques, non planes avec un ou deux accepteurs de liaisons hydrogènes (Lewis et al., 2004). Le CYP2B6 est impliqué dans le métabolisme de médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques dont les anti-rétroviraux, les anti-dépresseurs, les anesthésiques et les anti-cancéreux (Turpeinen et al., 2006). Par ailleurs, le CYP2B6 est aussi connu pour jouer un rôle dans les processus de détoxification et de bioactivation d'un grand nombre de produits chimiques environnementaux, de pesticides et de procarcinogènes (Hodgson and Rose, 2007).

Les polymorphismes du CYP2B6 sont caractérisés par un grand nombre de mutations à la fois dans les régions codantes et non codantes du gène (Lamba et al., 2003; Lang et al., 2001; Zanger et al., 2007). Parmi les différents polymorphismes du CYP2B6, on retrouve le CYP2B6*6 qui est le plus fréquent. Celui-ci est caractérisé par 2 mutations d'acides aminés, Gln172His et Lys262Arg, ainsi que des SNPs (Single nucleotide Polymorphisms) localisés dans les régions non codantes de l'ADN. CYP2B6*6 a une fréquence de l'ordre de 15% à 50% selon

la population (Turpeinen and Zanger, 2012). La population africaine présente la plus grande fréquence tandis que la population asiatique présente la plus faible fréquence d'apparition. Le génotype CYP2B6*6 a été associé à une diminution de l'activité catalytique *in vivo*, en particulier dans le cas de patients atteints du VIH et traités à l'Éfavirenz, un anti-rétroviral (Telenti and Zanger, 2008). Un autre polymorphisme, le CYP2B6*4 avec une mutation Lys262Arg présente aussi chez CYP2B6*6 avec une fréquence de 2% à 6%, est associé à un métabolisme accru de certains substrats. Cependant, dans le cas du cyclophosphamide (CPA), l'effet opposé est observé. En effet, une diminution de la bioactivation du cyclophosphamide a été observée en présence du génotype CYP2B6*4 (Ariyoshi et al., 2011; Xie et al., 2003). La bioactivation du cyclophosphamide en 4-hydroxy-cyclophosphamide (4-OH-CPA) est très variable chez les patients atteints de cancer. Il existe de plus en plus de preuves qui démontrent que l'activation du cyclophosphamide et la réponse au traitement sont liées au génotype du CYP2B6. Par exemple, le polymorphisme CYP2B6*6 qui est corrélé à une diminution de l'activité pour plusieurs molécules, est associé à une augmentation de la bioactivation du CPA en 4-OH CPA (Nakajima et al., 2007; Xie et al., 2006).

Certaines molécules peuvent par exemple inhiber l'activité du cytochrome CYP2B6. Parmi ces inhibiteurs, nous retrouvons des anti-viraux (nelfinavir, éfavirenz et le ritonavir), des antidépresseurs (paroxétine, sertraline, norfluoretine et fluvoxamine) et des anti-fongiques (voriconazole, miconazole, sulconazole et tioconazole) (Turpeinen et al., 2006). Certains substrats du CYP2B6 peuvent aussi jouer le rôle d'inhibiteur dont l'efavirenz et la sertraline. Certains composés, non pharmaceutiques, comme les dérivés de benzylpyridine ont été démontrés comme étant de puissants inhibiteurs du CYP2B6 *in vitro* (Korhonen et al., 2007).

Le CYP2B6 humain est connu pour être induit par différentes molécules dont les inducteurs « classiques », tels que la rifampicine, la phénytoïne et le phénobarbital *via* les récepteurs nucléaires : PXR et CAR. Le CYP2B6 est souvent co-induit avec d'autres cytochromes P450 tels que ceux de la sous-famille CYP2C et le CYP3A (Faucette et al., 2007; Sueyoshi et al., 1999). Certains substrats du CYP2B6 peuvent également jouer le rôle d'inducteur du CYP2B6 favorisant ainsi leur propre métabolisation, ce qui est le cas du cyclophosphamide (Martin et al., 2003).

2.1 Métabolisme du Cyclophosphamide

Parmi les différents substrats du cytochrome P450 2B6, le cyclophosphamide (Endoxan®) est un agent alkylant bifonctionnel de la famille des oxazaphosphorines (Emadi et al., 2009) possédant des fonctions anti-cancéreuses et d'immunosupresseurs. C'est une pro-drogue inactive qui doit être métabolisée pour donner des métabolites actifs (**Figure 7**). Il est métabolisé au niveau hépatique, principalement par le CYP2B6, en 4-hydroxy-cyclophosphamide (Chang et al., 1993). Ce dernier est en équilibre avec son tautomère l'aldophosphamide. Par β -élimination spontanée, l'aldophosphamide va libérer la moutarde phosphoramidate, un agent alkylant, et l'acroléine qui est responsable de la toxicité vésicale observée avec de fortes doses de CPA (Giraud et al., 2010).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 7 : Métabolisme du Cyclophosphamide (CPA) (Madondo et al., 2016a).

Le cyclophosphamide est converti en 4 hydroxy-cyclophosphamide par le cytochrome p450 2B6 (CYP450). Le 4-hydroxy-cyclophosphamide est en équilibre avec l'aldophosphamide, son tautomère. Ces 3 molécules sont non toxiques. L'aldophosphamide va par β -élimination spontanée former l'acroléine et la moutarde phosphoramidate, le métabolite actif du cyclophosphamide. Les métabolites formés au cours de la métabolisation du CPA peuvent être détoxifiés en métabolites inactifs à l'aide d'enzymes tels que l'alcool déshydrogénase (ADH), l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ainsi que le glutathion S-transférase (GST) qui possède comme co-facteur le glutathion réduit (GSH).

La moutarde phosphoramidate, étant électrophile, va interagir avec l'ADN, qui lui est nucléophile. Ceci conduira à la formation de ponts intra- ou inter-caténaux rendant impossible la transcription ou la réplication de l'ADN. L'alkylation entraîne aussi la rupture de la double hélice d'ADN.

L'aldophosphamide peut également être métabolisé en carboxyphosphamide, qui est non toxique, par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Cette réaction est en compétition avec la β -élimination. Ainsi, des cellules ayant de faibles taux d'ALDH produiront plus de métabolites toxiques. Les métabolites actifs du CPA, la moutarde phosphoramidate et l'acroléine, peuvent aussi être détoxifiés par que les glutathion S-transférases (GST) en catalysant la conjugaison de glutathion réduit (GSH) avec ces métabolites (Ge et al., 2013). Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, enzyme de phase II de leur métabolisme.

Le CPA peut aussi être métabolisé par le CYP3A4 en déchloroéthyl-CPA qui est inactif et en chloroacétaldéhyde qui est responsable d'effets secondaires comme la neurotoxicité et la néphrotoxicité. Néanmoins, cette voie métabolique est mineure.

2.1.1 Pathologies traitées par le Cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est un médicament utilisé dans le traitement de plusieurs cancers comme le cancer du sein, le cancer ovarien, les lymphomes (hodgkiniens et non hodgkiniens) et le cancer pulmonaire, notamment à petites cellules. De plus, il est également utilisé comme immunosuppresseur dans les maladies auto-immunes (*cf. chapitre système immunitaire*). La principale utilisation du cyclophosphamide se fait en combinaison avec d'autres anti-cancéreux dans le traitement des lymphomes, de certaines formes de cancer du cerveau, de la leucémie (Shanafelt et al., 2007) et de certaines tumeurs solides (Young et al., 2006). Il s'agit d'un médicament utilisé principalement en chimiothérapie, et qui agit en induisant la mort des lymphocytes T.

Une étude de 2004 a montré que les actions biologiques du cyclophosphamide sont doses-dépendantes. En effet, aux doses les plus élevées, le cyclophosphamide est associé à une augmentation de la cytotoxicité et de l'immunosuppression, tandis qu'à des doses

faibles et en continu, le cyclophosphamide montre des propriétés immunostimulantes (Nicolini et al., 2004).

Au début des années 2000, un essai clinique impliquant la combinaison CYP2B6/CPA a été réalisé. En effet, Oxford Biomedica a développé une approche utilisant un vecteur rétroviral permettant le transfert du gène codant pour le CYP2B6 associé à un traitement au cyclophosphamide, appelé MetXia[®]. Une phase I a été entreprise sur 12 patients présentant un cancer du sein (9 patientes) ou un mélanome (3 patients), sur lesquels trois doses de MetXia-P450 ont été testées. Le vecteur rétroviral a été injecté directement dans la tumeur pendant deux jours consécutifs, suivi du traitement par le CPA (*per os*) (Braybrooke et al., 2005). Les résultats obtenus ont été très modestes puisque seule une patiente (cancer du sein) a présenté une réponse partielle avec une diminution significative du volume tumoral. Quatre patients ont, quant à eux, vu une stabilisation de la croissance tumorale pendant au moins 12 semaines tandis que pour les autres, c'est-à-dire 59% des patients, le volume tumoral a augmenté. Le faible niveau de transduction du gène CYP2B6 dans les tumeurs, moins de 1 % des cellules transduites, serait à l'origine de ces résultats. En outre, il est connu que les tumeurs expriment peu voire pas du tout de NADPH cytochrome P450 réductase (RED). Ainsi, ceci pourrait également expliquer la faible activation du CPA par le CYP2B6 du fait d'un faible transfert d'électrons. Par ailleurs, le CYP2B6 présente une faible affinité pour le cyclophosphamide de l'ordre de 4 à 5 mM. Nous avons, par conséquent, cherché à augmenter la capacité de métabolisation du CYP2B6 par mutagénèse dirigée.

2.2 Construction du triple mutant : le CYP2B6TM-RED

La construction du triple mutant (CYP2B6TM-RED) s'est déroulée en plusieurs étapes. La première fut l'étude structurale par modélisation moléculaire *in silico* du CYP2B6. Etant donné qu'au moment de cette étude, le CYP2B6 n'était pas encore cristallisé, les Dr. Nguyen TA. et André F. ont décidé de la prédire à partir de celle du CYP2B4 de lapin qui possède la plus grande homologie de séquence en acides aminés (78%) avec le CYP2B6 (Nguyen et al., 2008; Scott et al., 2003).

Ainsi, grâce à la structure cristallisée du CYP2B4, complexée à un inhibiteur spécifique

possédant une taille et une structure chimique identique au cyclophosphamide, le 4-(4-chlorophenyl) imidazole (CPI), ils ont pu identifier 4 acides aminés situés à proximité de l'inhibiteur (donc du CPA) au niveau du site actif. Ces 4 acides aminés ont été mutés en différents acides aminés polaires, hydrophobes, chargés ou non et exprimés dans la levure *Saccharomyces Cerevisiae* afin d'étudier leurs constantes cinétiques (K_m et V_{max}) et mesurer l'hydroxylation du CPA. Leur résultats ont mis en évidence que, 2 mutants (I114V et V477W) métabolisaient chacun deux fois plus efficacement le CPA que le CYP2B6 sauvage (CYP2B6wt). Ensuite, la combinaison des 2 mutations (I114V/477W) a permis la construction d'un double mutant capable de métaboliser le CPA quatre fois plus efficacement que le CYP2B6wt (Nguyen et al., 2008).

Parmi les différentes isoformes du CYP2B6, le CYP2B11 du chien était le plus efficace (efficacité catalytique 13 fois plus élevée). Un alignement des séquences de reconnaissance du substrat (SRS) des différentes isoformes orthologues de plusieurs espèces a été réalisé. Il a permis d'identifier six mutations présentes uniquement dans le CYP2B11. De ces 6 mutations, une seule (L199M) permettait d'augmenter l'efficacité du CYP2B6 par un facteur 2 comparé au CYP2B6wt (Nguyen et al., 2008).

Suite à cela, la construction d'un triple mutant réunissant les 3 mutations décrites précédemment (I114V/V477W/ L199M) a été réalisée. Ce triple mutant possède une capacité à métaboliser le CPA 8 fois plus élevée que le CYP2B6wt essentiellement due à une meilleure affinité du CPA pour le triple mutant (Touati et al., 2014a). La modélisation du CYP2B6, (3IBD.pdb : <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ibd>), a plus tard permis de montrer que le tryptophane en position 477 réduisait la taille du site actif et limitait les déplacements du substrat, et que la valine en position 114 favorisait son positionnement par rapport à l'hème. Ainsi, ces 2 mutations, mis en évidence précédemment (I114V et V477W) amélioraient la métabolisation du CPA. Le dernier acide aminé 199, situé dans le canal d'entrée du substrat et de sortie des métabolites, permettrait donc de faciliter l'entrée du CPA en remplaçant la leucine par une méthionine.

Une dernière étape à la construction du triple mutant a été l'ajout de la réductase (RED). En effet, les cytochromes P450 ont besoin d'électrons pour métaboliser leurs substrats. Ces électrons sont fournis par la NADPH-CYP réductase (RED). Etant donné la faible expression de la RED au sein de nombreuses tumeurs (Fitzsimmons et al., 1996; Yu et al., 2001), la RED humaine a été fusionnée au triple mutant CYP2B6 par un linker, composé

de trois sérines et d'une thréonine, pour former un gène de fusion, le **CYP2B6TM-RED**. Ainsi, dans une même cellule tumorale, les 2 gènes seront exprimés permettant 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 et aux États-Unis en 2016 (phase européenne en cours) (patent PCT/EP2012/058219) (Touati et al., 2014a).

Des études *in vitro* sur des lignées pulmonaires humaines (A549) et murines (TC1) ont permis de mettre en évidence l'efficacité du gène **CYP2B6TM-RED**. Celui-ci a été exprimé dans ces cellules à l'aide d'un lentivirus (**LV- CYP2B6TM-RED**). Les cellules transduites avec le gène mutant et traitées au CPA deviennent sensibles à ce dernier présentant une diminution de l'IC₅₀ (IC₅₀ = 0,5 mM) par comparaison à des cellules exprimant le CYP2B6wt (IC₅₀ ~ 0 6-7mM) (Touati et al., 2014a; Tychopoulos et al., 2005). Un effet "by-stander" a également été mis en évidence.

En complément de ces travaux, des études *in vivo* ont été réalisées sur des souris immunocompétentes. Une éradication complète des tumeurs a été observée après 4 injections de CPA sur des souris xénotreffées avec des cellules tumorales exprimant le gène suicide. L'effet "by-stander" a été démontré par l'éradication des tumeurs, dont un quart des cellules exprimait le gène suicide, après 5 injections de CPA. Par ailleurs, une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les cellules tumorales a été observée. Une expérience de re-challenge consistant à réinjecter des cellules tumorales n'exprimant pas le gène suicide chez les souris en rémission de leur tumeur initiale deux mois après l'arrêt du traitement par le CPA a permis de le démontrer. Des souris contrôles, du même âge, n'ayant pas été traitées auparavant ont également reçu cette injection de cellules tumorales. Seules les souris contrôles développaient des tumeurs. Chez les souris en rémission, les tumeurs ont commencé à se développer puis ont régressé spontanément, sans aucun traitement (Touati et al., 2014a). Ce triple mutant-RED est 13 fois plus actif que le CYP2B6wt. Son efficacité a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, l'implication du système immunitaire dans la stratégie **CYP2B6TM-RED/CPA** a été mise en évidence, ce qui est un enjeu majeur dans la réussite de toute thérapie anti-cancéreuse.

V. Le système immunitaire

1. Réponse immunitaire anti-tumorale

La théorie de l'immuno-surveillance des tumeurs, introduite par Ehrlich dans le début du XX^{ème} siècle, suggère qu'une des fonctions essentielles du système immunitaire est de détecter et d'éliminer les tumeurs (Töpfer et al., 2011). Par conséquent, la probabilité de développer une tumeur devrait être plus importante lorsque l'immunité innée et / ou adaptative est altérée ou bien réprimée. Cette hypothèse se repose sur des données épidémiologiques qui mettent en évidence qu'une augmentation de la fréquence de certains cancers est associée à un déficit immunitaire (Bower et al., 2006; Penn, 2000). L'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales peut conduire à différentes phases. La phase d'élimination : les effecteurs cellulaires, les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et les cellules NK, détruisent les cellules tumorales. La phase d'équilibre durant laquelle la prolifération tumorale est limitée par une réponse immunitaire encore efficace. Pour finir, la phase d'échappement au cours de laquelle le système immunitaire est totalement dépassé par la croissance tumorale.

1.1 Les cellules NK (Natural Killer)

Les cellules NK ont la morphologie des lymphocytes mais elles ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes. Ces cellules reconnaissent les cellules tumorales ou infectées par un pathogène de deux manières différentes. Une des voies de reconnaissance dépend du fait que des cellules « anormales » exposent des antigènes contre lesquels le système immunitaire a développé une réponse anticorps. Les cellules NK possèdent à leur surface des récepteurs membranaires pour l'extrémité carboxy-terminale de la molécule d'IgG, appelée Fc. Ainsi, les NK vont pouvoir se fixer aux anticorps, eux-même fixés à la surface des cellules cibles (interaction anticorps-antigènes), et induire une cytotoxicité cellulaire.

L'autre voie par laquelle les cellules NK peuvent reconnaître les cellules « anormales » se fait par l'intermédiaire de récepteurs pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I présents à leur surface. Si le récepteur présent

à la surface des cellules NK n'interagit pas avec le CMH I des cellules anormales, les cellules NK vont lyser cette cellule cible. Cette lyse se fait *via* la sécrétion de perforine à la surface des cellules cibles, qui va lyser la membrane cellulaire et ainsi permettre l'entrée de granzymes dans les cellules cibles à travers les pores membranaires et induire l'apoptose des cellules cibles.

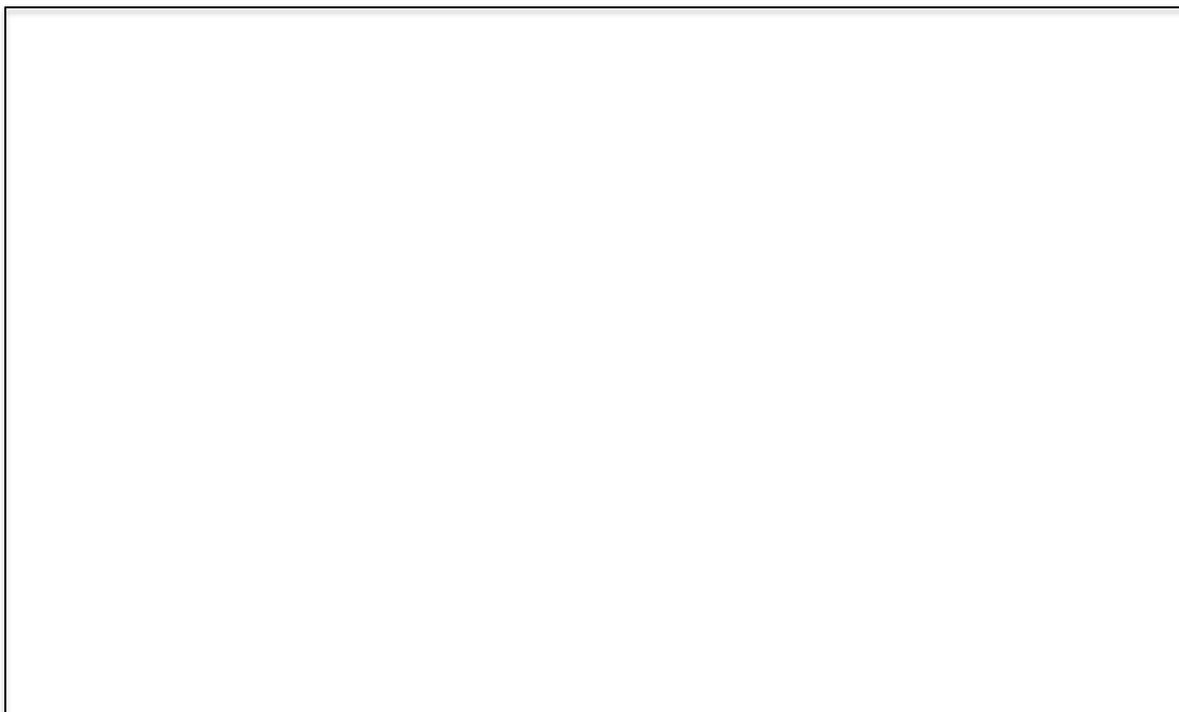
Dans le cas de cellules « normales » étant donné qu'elles possèdent des molécules du CMH de classe I, elles vont pouvoir se lier aux récepteurs présents à la surface des NK ce qui va inhiber l'activation de ces dernières et ainsi empêcher l'induction de la mort des cellules « normales ». Dans certains cas, les cellules tumorales ou infectées par des virus, présentent une dérégulation des molécules du CMH de classe I. Ceci est un avantage vis-à-vis des lymphocytes T qui ne les reconnaîtront pas. Néanmoins, elles n'empêcheront pas les cellules NK de les reconnaître.

1.2 Les lymphocytes T

1.2.1 Présentation de l'antigène

Pour être reconnu par les lymphocytes T, l'antigène doit être complexé à des protéines du CMH. Ce complexe antigène-CMH va activer les lymphocytes T par deux voies différentes, selon la classe du CMH (**Figure 8**):

- L'antigène, telles que des protéines virales ou tumorales, peut être produit de façon endogène par les cellules dites « anormales ». Il va ensuite être complexé avec des protéines du CMH de classe I présents à la surface des cellules spécialisées qui sont les cellules présentatrices d'antigènes par des mécanismes de traitements intra-cellulaires.
- Par ailleurs, l'antigène peut également être relargué par les cellules tumorales ou infectées. Il va ensuite pouvoir être capturé, par endocytose, par les cellules présentatrices d'antigènes. L'antigène va ainsi pouvoir être complexé avec des molécules du CMH de classe II et être exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 8 : Présentation de l'antigène. (Système HLA, présentation de l'antigène et réponse immunitaire)

Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent des peptides issues de la dégradation de protéines exogènes et présentés par les molécules CMH de classe II (CMH-II). Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent des peptides issues de la dégradation de protéines endogènes et présentés par les molécules CMH de classe I (CMH-I).

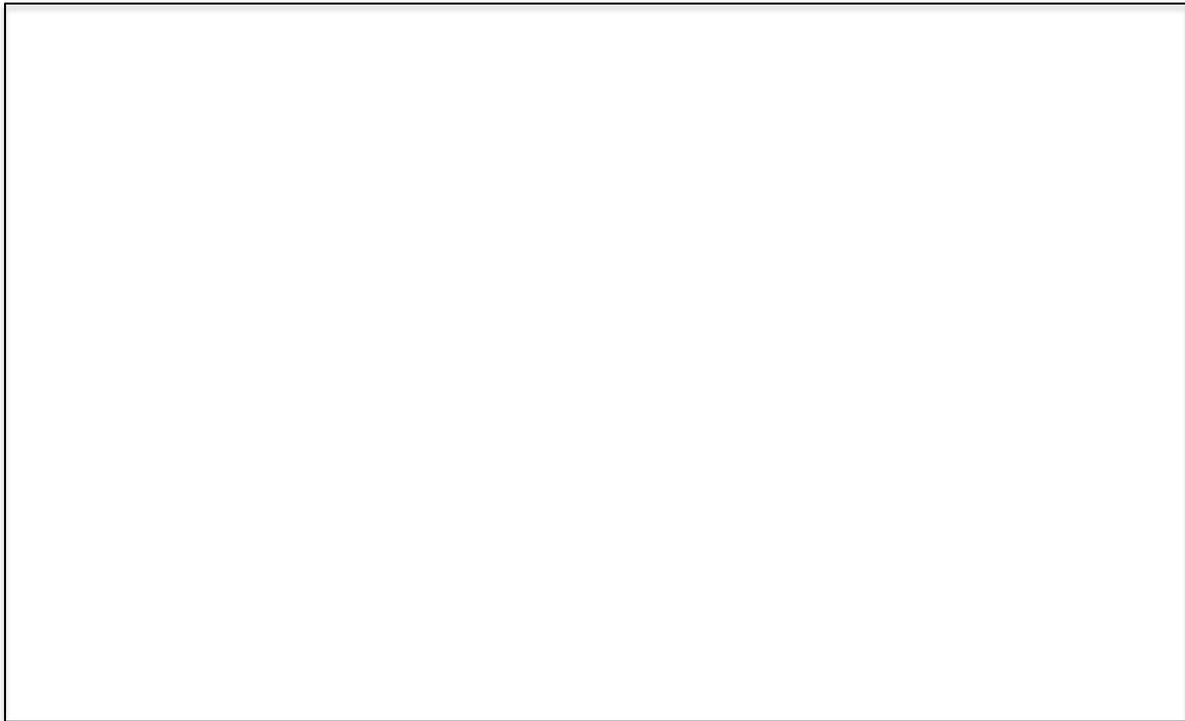
Il existe trois types de cellules présentatrices d'antigènes : les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Ces trois types diffèrent par leur mode de capture, le mode d'expression des protéines du CMH, la présentation des antigènes et leur localisation dans l'organisme.

- Les **cellules dendritiques** immatures vont phagocytter les antigènes viraux ainsi que les pathogènes extra-cellulaires dans les tissus périphériques. Lors de leur migration vers les ganglions et en présence de signaux inflammatoires, ces cellules vont maturer et ainsi exprimer de nombreuses molécules de co-stimulation favorisant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Par ailleurs, ce sont les seules cellules aptes à activer les

lymphocytes T naïfs.

- Les **macrophages** sont des cellules phagocytaires qui existent sous forme inactive et active. Ils sont activés par des cytokines et par la présence de micro-organismes. C'est seulement sous forme active que ces cellules expriment les protéines du CMH de classe II et qu'elles deviennent donc des cellules présentatrices d'antigènes. Les macrophages sont présents dans tout l'organisme et vont capturer les micro-organismes ainsi que les particules extra-cellulaires. Ces cellules expriment aussi des molécules de co-stimulation.

- Les **lymphocytes B** vont eux présenter des antigènes solubles (toxines, virus). Ces antigènes vont se fixer *via* des immunoglobulines (Ig) de surface : BCR (B cells receptor). Ensuite, les antigènes vont être internalisés par endocytose, complexés avec les protéines du CMH de classe II, pour enfin être exprimés à la surface des lymphocytes B.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 9: Activation des Lymphocytes T (OpenStax, 2013)

Les lymphocytes T naïfs $CD4^+$ engagent des molécules du CMH II présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et deviennent actives. Les clones des lymphocytes T auxiliaires activés, vont à leur tour, activer les lymphocytes B et les lymphocytes T $CD8^+$, qui deviennent des lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T cytotoxiques tuent les cellules infectées.

La reconnaissance de l'antigène par le récepteur des lymphocytes T diffère selon le type de lymphocyte qu'il soit $CD4^+$ ou $CD8^+$ (**Figure 9**). Les lymphocytes $CD4^+$ reconnaissent uniquement l'antigène complexé avec le CMH de classe II, tandis que les lymphocytes $CD8^+$ reconnaissent le complexe antigène-CMH de classe I. Étant donné que les cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ possèdent des fonctions très différentes, la molécule du CMH qui est utilisée pour présenter l'antigène déterminera le type de réponse effectrice générée.

L'antigène complexé avec le CMH de type I va activer les lymphocytes $CD8^+$ cytotoxiques. Étant donné que toutes les cellules nucléées expriment le CMH de classe I, cela signifie que toutes cellules infectées par un virus ou un autre agent pathogène intracellulaire peuvent présenter ces antigènes et être éliminées par attaque cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$.

Ceci est le cas des antigènes tumoraux, qui sont à l'origine de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et donc à l'élimination des tumeurs dans notre stratégie par gène suicide (Touati et al., 2014a; Amara et al., 2016). Tandis que les réponses CD8 cytotoxiques sont très ciblées, l'activation CD4 conduit, quant à elle, à la production de cytokines qui activent à leur tour une large gamme de cellules autour d'eux (**Figure 9**).

Un filet de sécurité permettant d'éviter la présentation inappropriée de l'antigène ou l'attaque des cellules effectrices est mis en place. En effet, la liaison du récepteur des cellules T au complexe antigène-CMH seul n'est pas suffisante pour induire l'activation des lymphocytes. La stimulation de co-récepteurs est également nécessaire pour aboutir à une activation optimale des lymphocytes T (Parkin and Cohen, 2001).

→ Cas particulier de la réponse anti-tumorale :

La réponse immunitaire anti-tumorale va dépendre de la qualité de la cellule présentatrice de l'antigène. Les macrophages et les lymphocytes B n'exercent que très rarement un rôle favorable sur l'activité des lymphocytes T CD4 / CD8 lors de la réponse anti-tumorale (Banchereau and Steinman, 1998; Qin et al., 1998). Les cellules dendritiques, quant à elles, présentent les caractéristiques essentielles des effecteurs de l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, ces cellules sont aptes à stimuler les lymphocytes T naïfs, au stade mature, avec une grande efficacité et également à les activer au niveau des organes lymphoïdes secondaires de par leur capacité migratoire (Steinman et al., 1997).

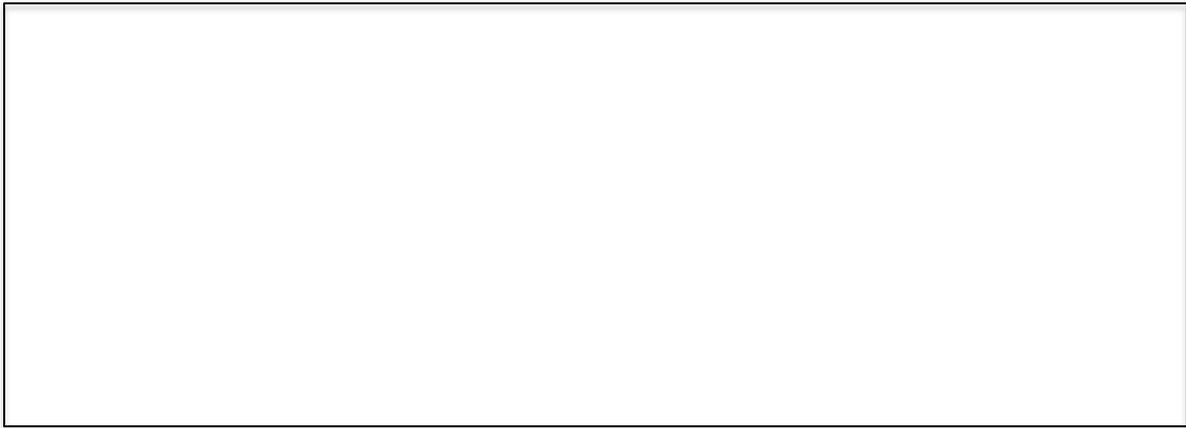
1.2.2 Les lymphocytes T effecteurs :

Deux types de lymphocytes T effecteurs ont été identifiés, les T helper (Th) et les T cytotoxiques (Tc). Ils portent respectivement à leur surface les molécules CD4 et CD8. Les Th CD4⁺ sont les cellules qui orchestrent la réponse immunitaire. Elles reconnaissent l'antigène étranger et activent d'autres constituants de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans le but d'éliminer le pathogène. Elles sont aussi impliquées dans l'activation des lymphocytes B. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique, quant à eux, jouent un rôle primordial

dans l'activité anti-virale et anti-tumorale. Ces deux types lymphocytaires participent grandement au contrôle intra-cellulaire des pathogènes.

a. Les lymphocytes Th CD4+ :

Les lymphocytes Th sont divisés fonctionnellement selon le type de cytokines qu'ils produisent (**Figure 10**) (Swain et al., 1991). Lors de la stimulation par des cytokines, les lymphocytes précurseurs Th0 deviennent soit des cellules Th1 ou soit des cellules Th2. Ces cellules sont morphologiquement indiscernables, seules les cytokines sécrétées diffèrent. De plus, la réponse qu'ils génèrent est très différente. Les cellules Th1 produisent de l'interleukine 2 (IL-2) qui induit une prolifération des lymphocytes T, stimule la division et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+. L'autre cytokine importante produite par les cellules Th1 est l'interféron γ (IFN γ) qui active les macrophages pour tuer les agents pathogènes intracellulaires tels que les mycobactéries, les champignons et des protozoaires. Il active également les cellules NK. L'importance de l'interféron γ dans la réponse immunitaire a été démontrée chez les patients dépourvus de récepteurs à l'interféron γ qui souffrent de graves infections mycobactériennes (Newport et al., 1996). Il existe une boucle de rétroactivation positive : en effet, l'interféron γ va stimuler la différenciation des cellules Th0 en cellules Th1 et va inhiber la différenciation en Th2. L'interleukine 12 (IL-12), sécrétée par les macrophages suite à l'induction par l'interféron γ , va augmenter la production d'interféron γ par les lymphocytes T.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 10: Différenciation des lymphocytes T helper (Burkholder et al., 2014).

Tous les lymphocytes T auxiliaires sont différenciés en différents types cellulaires à partir du même lymphocyte T progéniteur (Th0). En fonction du type de cytokines auxquelles les cellules Th0 sont exposées, elles peuvent se différencier en un phénotype de T helper existant : lymphocytes de type 1 T helper (Th1), les lymphocytes de type 2 T helper (Th2), les lymphocytes T régulatrices (Tregs) ou les lymphocytes de type 17 T helper (Th17). Les lymphocytes Th1 et Th2 sont généralement considérés comme des phénotypes permanents. Certaines données in vitro suggèrent que les lymphocytes Tregs et Th17 peuvent être un peu plus malléables; les cytokines impliquées dans ces inter-conversions proposées de lymphocytes T sont indiqués par un point d'interrogation (?). Les lymphocytes effecteurs sécrètent des cytokines qui vont induire des réponses distinctes et spécifiques de la réponse adaptative.

A l'inverse, les cellules Th2 produisent de l'interleukine 4, 5, 6 et 10 favorisant la production d'anticorps. Par exemple, l'interleukine 4 va activer les lymphocytes B en les différenciant en plasmocytes. Quant à l'interleukine 5, elle favorise la croissance des éosinophiles. De la même manière que l'interféron γ pour les cellules Th1, l'interleukine 4 induit une boucle de rétroactivation en favorisant la différenciation des Th0 en cellules Th2. Ces derniers sont associés aux allergies en induisant la production d'IgE. Par conséquent, les lymphocytes Th1 peuvent être associés à une immunité cellulaire, tandis que les lymphocytes Th2 sont associés à une immunité humorale.

Les lymphocytes Th17 sécrètent, quant à eux, les interleukines 17A (IL-17A), 17F (IL-17F) et l'hétérodimère IL-17A /F. Ces interleukines possèdent un pouvoir inflammatoire puissant et peuvent induire le recrutement des neutrophiles. Les cellules Th17 sont impliquées dans les réponses immunitaires dirigées contre des bactéries extracellulaires et les champignons. Elles sont aussi engagées dans certaines maladies auto-immunes tels que

la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, le psoriasis et la maladie de Crohn (Fujino et al., 2003; Kotake et al., 1999; Tzartos et al., 2008; Wolk et al., 2006).

→ *Les lymphocytes Tregs*

Enfin parmi les lymphocytes T, nous retrouvons les T régulateurs (Tregs) (**Figure 10**). Ces cellules constituent environ 10% des lymphocytes T CD4⁺ et jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et de l'auto-tolérance immunitaire (Sakaguchi et al., 2008; Wing and Sakaguchi, 2010). Il existe deux types de Tregs : les naturels et les inductibles. Les Tregs naturels sont présents chez l'Homme dès la 13^{ème} semaine après la naissance dans le thymus. Ces cellules sont nécessaires au développement fœtal (Cupedo et al., 2005). Les Tregs inductibles, quant à eux, proviennent de la différenciation des lymphocytes Th0 induite par le TGF β. Les Tregs sont impliqués dans les mécanismes de tolérance dans les réponses immunitaires anti-tumorales, le contrôle des maladies auto-immunes et ainsi que dans l'allo-transplantation (Ehrenstein et al., 2004; Miyara et al., 2005). Ils diminuent l'expression des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices d'antigènes ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activation des lymphocytes T effecteurs : CD4⁺ et CD8⁺ (Cederbom et al., 2000; Grossman et al., 2004). De plus, ils favorisent leur production en inhibant la différenciation des Th0 en Th1.

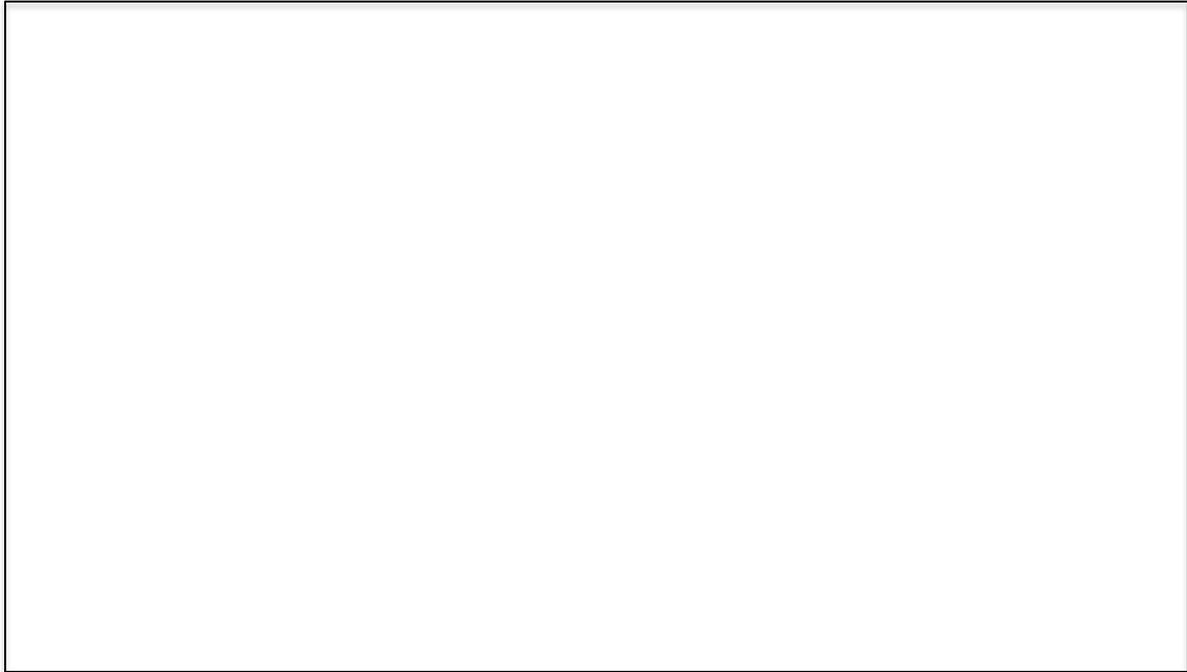
La fonction des lymphocytes Tregs est sous le contrôle de l'expression du facteur de transcription Foxp3. Il a été démontré que l'absence de Foxp3 dans les Tregs provoquait la perte de leurs fonctions cellulaires aboutissant à divers troubles immunitaires graves telles que une auto-immunité généralisée et des immunopathologies (Fontenot et al., 2003). Chez l'Homme, une mutation de Foxp3 est à l'origine de la maladie génétique IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy, X-linked syndrome) (Bennett et al., 2001).

Une diminution des lymphocytes Tregs aurait un impact positif sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ principalement. Par conséquent, les Tregs constitueraient potentiellement une cible thérapeutique intéressante dans le but d'accroître le nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans les traitements anti-cancéreux (*cf. Partie 2.1. Introduction CPA et Tregs*).

b. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ :

Les lymphocytes T CD8⁺ sont essentiels dans la protection contre les infections intracellulaires et les cancers (Williams and Bevan, 2007). La réponse immunitaire médiée par les CD8⁺ peut être décomposée en 3 phases :

- Tout d'abord, une phase effectrice « *Expansion phase* » durant laquelle les lymphocytes T cytotoxiques naïfs sont activés, prolifèrent rapidement, acquièrent leur fonction et migrent vers le site infectieux ou tumoral afin de tuer les cellules « anormales » en sécrétant des cytokines effectrices.
- Une deuxième phase, la « *Contraction phase* » durant laquelle la majorité des lymphocytes T CD8⁺ meurent par apoptose laissant seulement 5 à 10% de cellules vivantes correspondant aux cellules T mémoires.
- Et enfin, la dernière phase appelée la « *Maintenance phase* » au cours de laquelle les lymphocytes T CD8⁺ mémoires sont maintenus à des niveaux stables tout au long de la vie des souris et pour quelques dizaines d'années chez l'Homme (**Figure 11**) (Hammarlund et al., 2003; Williams and Bevan, 2007). Plus tard, lors d'une re-exposition à l'antigène, la réponse immunitaire des lymphocytes T mémoires sera plus rapide ce qui confèrera une meilleure protection à l'hôte.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 11 : Cinétique de la différenciation des lymphocytes T CD8 + après une infection virale. (Russ et al., 2013)

Les cellules présentatrices d'antigène (APC) présentent des antigènes viraux aux cellules T CD8 +. Cela déclenche une expansion clonale et la différenciation des cellules T CD8 + en cellules effectrices capables de sécréter des molécules pro-inflammatoires (TNF- α , d'IFN- γ) et cytotoxiques (perforine, granzyme). À la suite de la clairance virale, les cellules T CD8 + entrent en apoptose. Les cellules T CD8 + mémoires peuvent persister chez l'hôte pendant des années. Dans le cas d'une exposition secondaire au même virus, les cellules T CD8 + mémoire peuvent rapidement se développer et acquérir des fonctions effectrices.

Les lymphocytes T CD8+ sont cytotoxiques envers les cellules exprimant un antigène spécifique à leur surface. Les lymphocytes T CD8+ (Tc) agissent de la même manière que les cellules NK. En effet, après fixation par les récepteurs TCR (T Cell Receptor), ils sécrètent de la perforine afin de lyser la membrane cellulaire de la cellule cible. Cette lyse est suivie par la libération de granules cytoplasmiques contenant des granzymes qui vont activer les caspases entraînant la fragmentation de l'ADN et conduire à l'apoptose (**Figure 12 A**).

Les lymphocytes Tc peuvent aussi se lier aux cellules cibles exprimant à leur surface la molécule Fas, inductrice de mort. Les cellules Tc vont ainsi pouvoir interagir avec ces cellules cibles *via* leur ligand Fas (FasL) et activer la cascade apoptotique (**Figure 12 B**).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 12 : Mécanisme d'action des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques après une infection virale. (CD8+ T Cells / Bitesized Immunology)

Les lymphocytes Tc vont se différencier en Tc 1 et Tc 2. La différence entre ces deux types est liée au type de cytokines sécrétées par ces cellules. Il a été supposé que certaines cellules T CD8 + possèderaient une fonction suppressive dans la régulation négative de la réponse lymphocytaire (Parkin and Cohen, 2001).

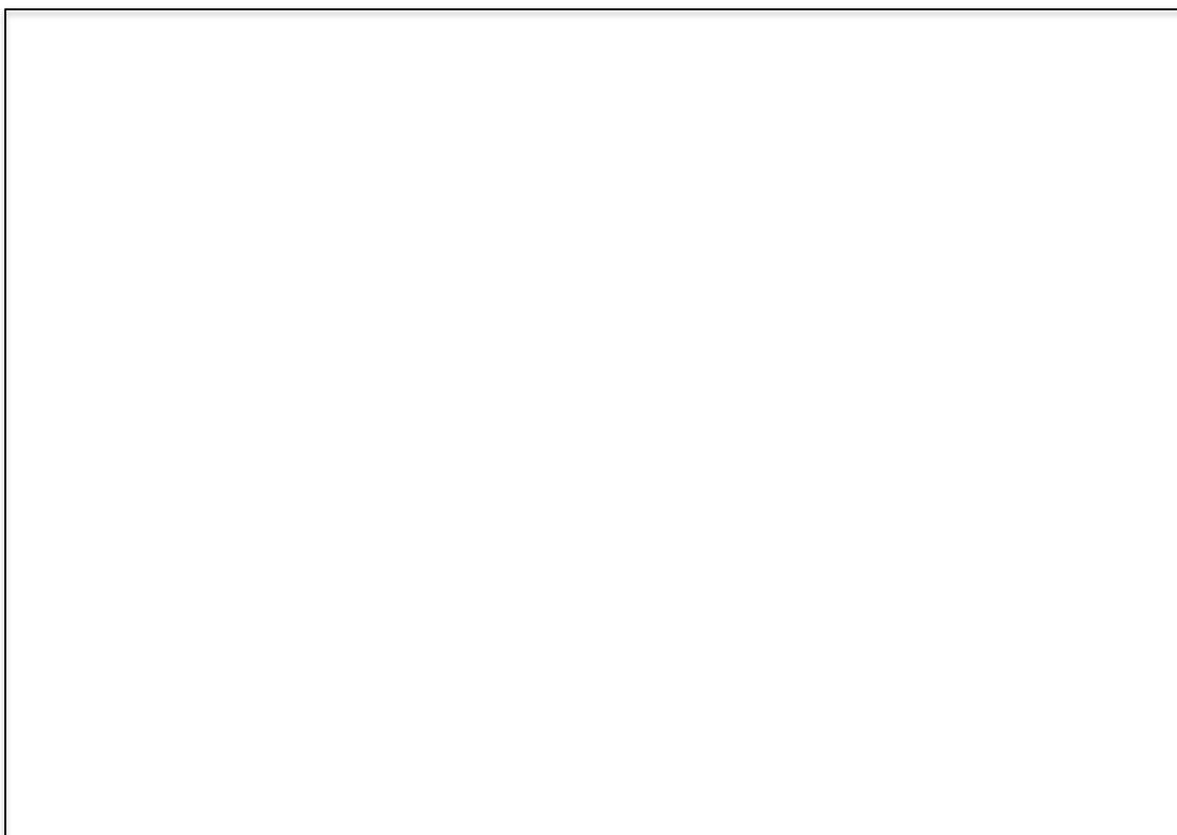
L'activation des macrophages *via* les CD4+ afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires, ainsi que le rôle des CD8+ dans la mort des cellules infectées par des virus, permet de contrôler toute infection intracellulaire qui échapperait à l'immunité innée.

2. Modulation des lymphocytes T par le cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est très utilisé dans le traitement d'un grand nombre de maladies, dont les hémopathies malignes, les cancers impliquant la formation des tumeurs solides et des maladies auto-immunes. L'activité biologique du CPA est dose dépendant. A de faibles doses, le CPA a des propriétés immunomodulatrices et anti-angiogéniques plus marquées. Il a également été mis en évidence que le CPA avait un impact sur les lymphocytes T CD4⁺, avec des effets opposés. En effet, le CPA va induire une déplétion des lymphocytes T régulateurs et va par ailleurs stimuler les lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ (**Tableau 1**).

2.1 Déplétion des lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les Tregs participent à la tolérance immunitaire des cancers (Sakaguchi et al., 2001; Shimizu et al., 1999). Plusieurs études ont démontré une accumulation des Tregs dans le sang périphérique et dans le microenvironnement tumoral chez des patients atteints de carcinomes (Wolf et al., 2003; Woo et al., 2002). Ainsi, une déplétion thérapeutique des Tregs pourrait améliorer les effets des immunothérapies cancéreuses (Onizuka et al., 1999; Steitz et al., 2001).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 13 : Les puissants effets immunomodulateurs du cyclophosphamide (Sistigu et al., 2011a).

Il a été constaté très tôt que l'efficacité à faible dose du cyclophosphamide (CPA) était due à la déplétion d'une population de lymphocytes T suppressifs, avant même que les Tregs soient découverts (**Figure 13**) (Awwad and North, 1988; North, 1982). A noter qu'une dose de CPA inférieure à 120 mg/kg est considérée comme faible (Madondo et al., 2016b). Ce ne fût qu'une dizaine d'années plus tard que la déplétion directe des Tregs par le CPA a été démontrée chez le rat et caractérisée comme étant transitoire (Lutsiak et al., 2005a). En effet, le 4^{ème} jour après une injection de 2 mg de CPA par souris, une déplétion des Tregs fut observée. Cependant, un retour à des niveaux de base, proches de ceux observés avant le traitement au CPA, a été mis en évidence 10 jours après l'injection (Lutsiak et al., 2005a). Chez les rongeurs, une seule injection de CPA peut entraîner la déplétion des Tregs. Chez l'Homme, une déplétion transitoire des Tregs n'est observée qu'après des injections

métronomiques de CPA à faibles doses (50 mg) (Ge et al., 2012a; Ghiringhelli et al., 2007). Par ailleurs, le groupe de Ghiringhelli a également montré que le CPA ne déplete pas seulement les Tregs présents dans le sang et dans les organes lymphoïdes mais diminue aussi le nombre de Tregs infiltrés dans les tumeurs (Roux et al., 2008). Récemment, notre équipe a mis en évidence une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en plus des Tregs après 4 injections de CPA à une dose de 140 mg/kg chez des souris (Touati et al., 2014a).

D'autres études ont également montré que la sensibilité des Tregs à être déplétés par le CPA serait liée à la nature proliférative de ces cellules (van der Most et al., 2009a). En règle générale, les Tregs prolifèrent peu pour maintenir leur homéostasie. Cependant, en cas de cancer, les Tregs voient leur prolifération fortement augmentée (van der Most et al., 2009a). Il a également été montré que la déplétion des Tregs est ATP dépendante. En effet, les Tregs présentent de faibles niveaux d'ATP intracellulaires vis à vis des autres lymphocytes T (Zhao et al., 2010) pouvant se traduire par de faibles niveaux de glutathion réduit (GSH). Par conséquent, les Tregs possèdent une capacité moins importante à détoxifier les métabolites du CPA (**Figure 7**). Une autre étude a démontré que les Tregs ont un défaut des voies de réparation de l'ADN en comparaison aux autres lymphocytes T effecteurs (Madondo et al., 2016c). Toutes ces études montrent que la sensibilité des Tregs à être déplétés par le CPA est multifactorielle.

Une faible dose de cyclophosphamide est capable de non seulement de dépleter les Tregs mais aussi de limiter leur fonction permettant ainsi une perte de leur effet suppressif. Après une injection intrapéritonéale de CPA à 100 mg/kg chez des souris, une action inhibitrice directe sur les cellules Tregs a été observée, caractérisée par altération de leur fonction en plus d'une diminution de leur nombre (Lutsiak et al., 2005a).

Par ailleurs, le CPA diminue les niveaux d'expression de GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrotic factor receptor-Related) et de FoxP3 (**Figure 13**) (Lutsiak et al., 2005a). GITR est exprimé à un haut niveau chez les Tregs et agit comme une molécule co-stimulatrice qui augmente la prolifération des Tregs (Liao et al., 2010). FoxP3, quant à lui, est impliqué dans l'activité suppressive des Tregs. Par conséquent, une diminution de l'expression de ces deux gènes par le CPA va induire une inhibition de la prolifération des Tregs ainsi qu'une diminution de leur fonction suppressive (Lutsiak et al., 2005a; Sistigu et al., 2011b).

De plus, il est à noter que le rapport de lymphocytes T effecteurs / Tregs au sein des tumeurs peut être un meilleur marqueur de l'efficacité du cyclophosphamide que la détermination du pourcentage de Tregs circulant chez les patients (Sistigu et al., 2011b).

Doses de CPA	Lymphocytes T	Résultats/observations	Références
30 mg/kg	Lymphocytes Tregs	Déplétion directe mais transitoire	Madondo et al., 2016b
2 mg/souris	Lymphocytes Tregs	Action inhibitrice du CPA sur la prolifération	Lutsiak et al., 2005
50 mg	Lymphocytes Tregs	Action inhibitrice de faibles doses de CPA (Chez l'Homme)	Ge et al., 2012
	Lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺	Activation de la prolifération	
100 mg/jour/semaine renouveler toute les 2 semaines	Tous les lymphocytes T	Action inhibitrice de fortes doses de CPA sur les toutes les populations de lymphocytes T avec une forte diminution de leur prolifération (Chez l'Homme).	Ghiringhelli et al., 2007
30 mg/kg chez la souris	Lymphocytes Tregs	Déplétion dans le sang et les organes lymphoïdes mais également ceux infiltrés au sein des tumeurs chez le rat et la souris.	Roux et al., 2008
100 mg/kg chez le rat			
140 mg/kg/semaine	Tous les lymphocytes T	Diminution des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ et forte diminution des Treg chez la souris	Touati et al., 2014
10 mg/kg	lymphocytes Th1 et Th2 CD4 ⁺	Activation des lymphocytes T helper 1 (Th1) et réduction des lymphocytes Th2	Matar et al., 2002
175 mg/kg tous les 6 jours	Lymphocytes T mémoires et CD8 ⁺	Augmentation des lymphocytes corrélée à une diminution de la production de NO.	Loeffler et al., 2005
100 mg/kg	Lymphocytes T CD4 ⁺ T helper 17 (Souris)	Augmentation du nombre de lymphocytes Th17 et des niveaux de Il-17 après traitement des patients avec de faibles doses de CPA	Viaud et al., 2011
50 mg/jour pendant 3 semaines	Lymphocytes T CD4 ⁺ T helper 17 (Homme)		

Tableau 1 : Etudes pré-cliniques et cliniques sur l'effet du cyclophosphamide sur les lymphocytes T CD4⁺

2.2 Amélioration de l'activité des lymphocytes T

effecteurs : CD4⁺ et CD8⁺

Il a été montré que de faibles doses de CPA augmentent la prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation non spécifique des récepteurs TCR (T Cell Receptor). Une amplification de la fréquence de lymphocytes T, spécifiques d'un antigène tumoral, a aussi été observée (Ge et al., 2012a; Ghiringhelli et al., 2007). Une étude a démontré, qu'après un traitement à faibles doses de CPA chez des rats ayant des tumeurs, un changement dans la production de cytokines par les lymphocytes Th a été observé. Effectivement, un traitement par le CPA a induit une augmentation significative de la sécrétion de IFN- γ et d'IL-2 (Matar et al., 2002). Ces cytokines sont produites spécifiquement par les lymphocytes Th1. A l'opposé, les niveaux de cytokines sécrétées par les lymphocytes Th2 telles que IL-10 et IL-4 sont diminués après le traitement (Matar et al., 2000). Une diminution des taux de TGF β ainsi que du monoxyde d'azote (NO) est également observée après le traitement au CPA (Loeffler et al., 2005; Matar et al., 2000). Par ailleurs, une réduction de la NO, dans le sérum, est corrélée avec l'augmentation des lymphocytes T mémoires et des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral (Loeffler et al., 2005).

De plus, une augmentation de la polarisation des lymphocytes Th17, qui sécrètent les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Liang et al., 2006; Wei et al., 2007), a aussi été mise en évidence après un traitement à une faible dose de CPA (100 mg/kg) (**Figure 13**) (Viaud et al., 2011a). Par ailleurs, une équipe a démontré que le CPA exerce un effet dose dépendante sur la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ produisant l'IL-17A, chez les souris C57BL / 6 contrôles et portant une tumeur (Viaud et al., 2011a). Les lymphocytes Th17 sont polyfonctionnels dans les tumeurs. Ils sécrètent les cytokines IL-2, TNF- α et IFN- γ . Ces cellules sont aussi retrouvées dans les infiltrats tumoraux et sont associées à la survie des patients dans les cancers ovariens (Kryczek et al., 2009; Munn, 2009). Après trois semaines de traitements à faibles doses de CPA chez des patients atteints de cancers avancés, les niveaux de IL-17 sont augmentés. Ces résultats mettent en évidence que de faibles doses de CPA vont induire l'augmentation du nombre de lymphocytes Th17 en cas de cancer (Sistigu et al., 2011b).

Le cyclophosphamide présente des effets immunomodulateurs sur les lymphocytes très intéressants et efficaces en déplaçant les lymphocytes Tregs tout en induisant la

prolifération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques d'un antigène tumoral. De plus, il est dépourvu de toxicité à faible dose et il est surtout très bon marché. Néanmoins, le CPA devra être comparé ou combiné avec de nouveaux réactifs et médicaments, dont les immunothérapies, existants qui conjointement peuvent offrir des traitements adjuvants précieux pour les thérapies anti-cancéreuses futures.

3. La mort immunogénique

Il a été mis en évidence depuis quelques années, que certains agents chimiothérapeutiques pouvaient induire une mort cellulaire dite immunogène. L'équipe du Pr. Kroemer a été la première à démontrer que lors d'une mort immunogénique, une réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales résiduelles est déclenchée (Apetoh et al., 2007a; Obeid et al., 2007a). Cette mort cellulaire immunogène peut être opposée à la mort cellulaire classique.

La mort immunogénique repose en effet sur la prédisposition de stimuli spécifiques pour tuer les cellules tout en provoquant l'émission coordonnée de signaux immunogènes (Garg et al., 2010; Hou et al., 2013; Krysko et al., 2012; Melis et al., 2013; Zitvogel et al., 2010). Ces signaux sont véhiculés par les DAMPS (Damage Associated Molecular Patterns). Ces DAMPS sont des molécules qui, dans des conditions physiologiques, ne sont pas en contact avec le système immunitaire. Ces molécules vont être libérées ou exposées à la membrane plasmique au cours de la mort cellulaire (Matzinger, 2002a, 2002b; Pouwels et al., 2014). Certains DAMPS exercent des effets immuno-stimulants robustes lors de leur liaison aux récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) qui sont exprimés par les cellules immunitaires.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 14 : Libération des signaux immunogènes (Bianchi, 2014).

La mort immunogénique : Les cellules peuvent subir un stress causé par différentes conditions telles que une lésion du tissu, par radiothérapie ou bien par des chimiothérapies. Les cellules cancéreuses vont mourir suite au traitement, mais le système immunitaire adaptatif sera alerté que si elles subissent une mort cellulaire immunogène. La mort immunogénique nécessite le relargage d'HMGB-1 et de l'ATP dans le milieu extracellulaire, et l'exposition de la calréticuline (CRT) à la surface des cellules.

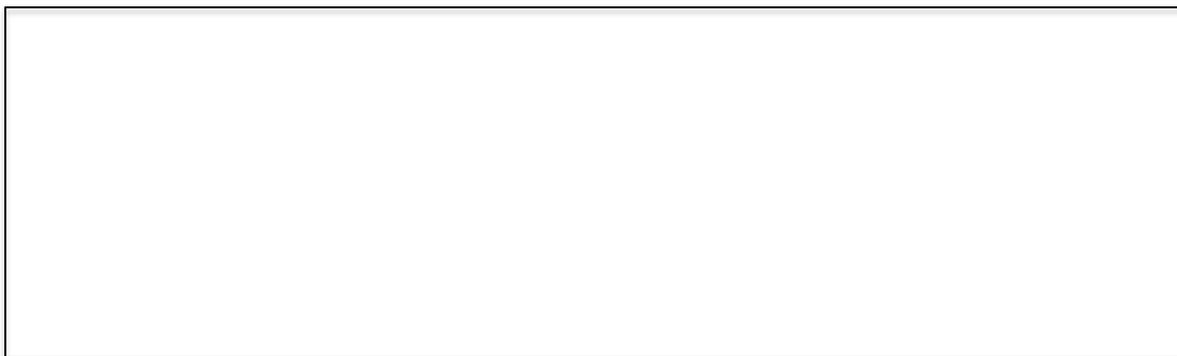
Jusqu'ici, trois DAMPS ont démontré leurs rôles clés dans le potentiel immunogène de tous les inducteurs de la mort immunogénique (**Figure 14**): **la calréticuline** (Garg et al., 2012a; Kepp et al., 2011, 2013, Obeid et al., 2007b, 2007c), **l'ATP** (Garg et al., 2012b; Hou et al., 2013; Lavieri et al., 2014; Martins et al., 2009) et **HMGB-1** (Apetoh et al., 2007b; Candolfi et al., 2009; Kohles et al., 2012; Rovere-Querini et al., 2004; Stoetzer et al., 2012, 2013). Ainsi, une mort immunogénique est une mort des cellules tumorales qui va stimuler, par l'intermédiaire des DAMPS, une réponse immunitaire contre les antigènes tumoraux des cellules.

3.1 Les signaux caractéristiques de la mort immunogénique

3.1.1 *La translocation de la calréticuline*

La calréticuline (CRT) est une protéine chaperonne localisée habituellement dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle participe au repliement correct des protéines du réticulum endoplasmique (Oliver et al., 1999). La calréticuline est aussi impliquée dans l'homéostasie du calcium (Coppolino et al., 1997).

La translocation de la calréticuline est une étape précoce de la mort cellulaire immunogène. Celle-ci est exposée à la surface des cellules lors des deux formes de l'apoptose (immunogénique et non immunogénique) avec une différence temporelle entre les deux. Lors de l'apoptose non immunogène, l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules mourantes se produit en même temps que celle de la phosphatidylsérine (PS) à un stade **apoptotique tardif**. À l'opposé, son exposition lors de la mort immunogénique a lieu à une étape **pré-apoptotique**, c'est à dire avant l'externalisation de la phosphatidylsérine et la perméabilisation de la membrane plasmique suite à un stress du réticulum endoplasmique (Obeid et al., 2007b; Panaretakis et al., 2009; Sonnemann et al., 2010; Tesniere et al., 2008). Cette translocation est le résultat du transport antérograde de la calréticuline *via* l'appareil de Golgi suivi d'une exocytose des vésicules contenant la calréticuline au niveau de la membrane plasmique (Garg et al., 2012b).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 15 : Exposition de la calréticuline (Zitvogel et al., 2010).

Les cellules mourantes exposent la calréticuline à un stade précoce du processus apoptotique, ce qui va faciliter l'engloutissement par les cellules dendritiques.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette mort immunogénique caractéristique ont été étudiés en détail et semblent impliquer trois étapes de signalisation distincts: (1) un module de **stress du réticulum endoplasmique** centré autour de la phosphorylation du facteur d'initiation eucaryote 2 α (eIF2 α) entraînant l'arrêt de la synthèse protéique ; (2) un module **apoptotique** impliquant l'activation de la caspase-8 et enfin (3) un module d'**exocytose** nécessitant le cytosquelette d'actine ainsi que VAMP1 et SNAP 25, deux protéines impliquées dans le trafic vésiculaire intracellulaire. En effet, la translocation de la CRT survient suite au stress du RE qui passe par l'activation de la protéine kinase PERK qui phosphoryle eIF2 α (Panaretakis et al., 2009).

Par ailleurs, des études ont montré que dans certains modèles, la calréticuline est obligatoirement transloquée à la surface des cellules avec une autre protéine chaperonne du réticulum endoplasmique : ERp57 (Panaretakis et al., 2008). L'exposition de la calréticuline va provoquer un signal phagocytaire majeur, un signal « eat me », pour les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques. Ceci aura pour conséquence d'améliorer leur capacité à phagocyter les cellules mortes (**Figure 15**) (Obeid et al., 2007b; Chao et al., 2010; Garg et al., 2012b; Gilardini Montani et al., 2015; Weiss et al., 2010).

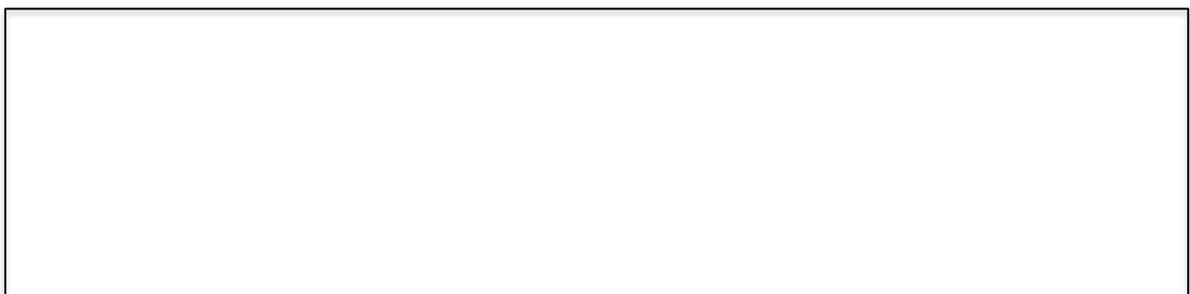
La délétion de la calréticuline ou de l'ERp57 inhibe l'immunogénicité de la mort cellulaire dans plusieurs modèles tumoraux (Obeid et al., 2007b, 2007d) et l'utilisation d'une

calréticuline recombinante s'est avérée capable de rétablir une mort immunogène même avec des traitements considérés comme non-immunogènes (Panaretakis et al., 2008).

3.1.2 La sécrétion d'HMGB-1

HMGB-1 (High Mobility Group Box-1) est une protéine nucléaire liée à la chromatine mais n'appartenant pas au groupe des histones. Elle est constituée de deux domaines de liaison à l'ADN qui participent à la régulation de la transcription en modifiant la conformation de la chromatine. HMGB-1 peut être libérée passivement par les cellules subissant une nécrose ou activement par les cellules immunitaires. Il a été montré que HMGB-1 peut aussi être relarguée lors de la nécrose secondaire qui suit l'apoptose ou l'autophagie (Scaffidi et al., 2002).

Le relargage d'HMGB-1 des cellules mourantes exige la perméabilisation des membranes nucléaires et plasmiques (**Figure 16**). Ce qui constitue *de facto* un événement post-mortem (Galluzzi et al., 2012). L'autophagie serait, dans certaines circonstances, à l'origine de la libération d'HMGB-1 à partir de cellules mourantes (Thorburn et al., 2009a). Cependant, le mécanisme moléculaire qui est à la base de cette étape cruciale de la mort immunogène des cellules n'a pas encore été éclairci.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 16 : Relargage d'HMGB-1 (Zitvogel et al., 2010).

Les molécules d'HMGB-1 libérées par les cellules mourantes vont se lier aux récepteurs TLR4 sur les cellules dendritiques, favorisant ainsi la présentation de l'antigène et stimulant la production de la pro-interleukine- β (pro-IL-1 β).

L'HMGB-1, une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, va agir comme un facteur de l'inflammation. Cet effet pro-inflammatoire va être provoqué par son interaction avec ses différents récepteurs présents sur la surface des cellules dendritiques, que sont RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) et les TLR (Toll-Like Receptor) 2 et 4.

Lors de la mort immunogénique, la liaison d'HMGB-1 à TLR4 va inhiber la fusion du phagosome, contenant les corps apoptotiques phagocytés par les cellules dendritiques, avec les lysosomes (Apetoh et al., 2007b). Ceci empêche la dégradation des antigènes tumoraux et facilite leur apprêtement ainsi que leur présentation par les cellules dendritiques aux lymphocytes T naïfs (Shiratsuchi et al., 2004). Le mécanisme qui permet l'inhibition de la fusion des phagosomes et lysosomes reste inconnu à ce jour. La liaison d'HMGB-1 au TLR4 permet aussi l'induction de l'expression de la interleukine IL-1 β par les cellules dendritiques (Sha et al., 2008). Il a été démontré que l'efficacité des chimiothérapies immunogènes est TLR4 dépendante chez la souris (Apetoh et al., 2007b, 2007c).

L'HMGB-1 extracellulaire posséderait une activité chimiotactique en formant un complexe avec la chimiokine (C-X-C motif) ligand 12 : CXCL12 qui se fixera au récepteur CXCR4 (Schiraldi et al., 2012).

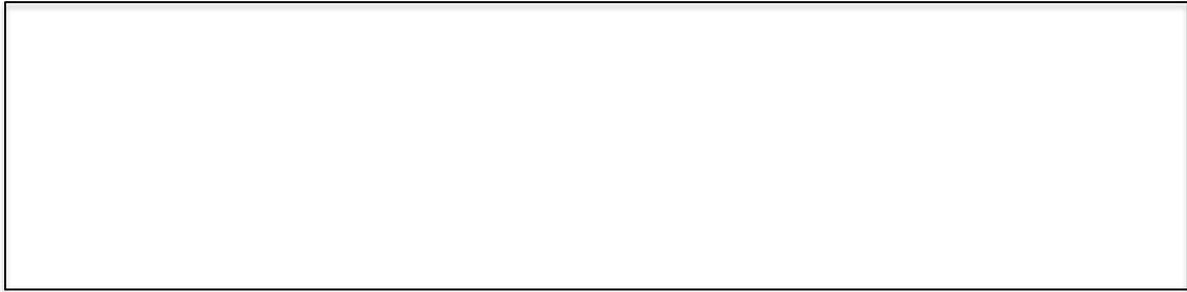
3.1.3 La libération d'ATP

La libération de l'adénosine triphosphate (ATP) dans le milieu extracellulaire est le troisième signal de la mort immunogène. Le relargage de l'ATP par les cellules apoptotiques est considéré comme un signal « find me » qui attire les phagocytes et les macrophages vers le site de l'apoptose.

Le mécanisme de sécrétion de l'ATP est différent selon le stade apoptotique de la cellule. Dans un contexte pré-apoptotique, l'ATP est sécrété par exocytose active (Garg et al., 2012b). Lorsque les cellules sont à un stade apoptotique précoce, l'autophagie semble être indispensable pour la sécrétion de l'ATP. L'extinction des gènes impliqués dans l'autophagie (ATG3, ATG5) atténue l'immunogénicité des cellules mourantes (Zitvogel et al., 2012). L'induction de l'autophagie par la molécule STF-62247 augmente le potentiel immunostimulateur de la mort immunogénique. Néanmoins, ceci ne semble pas s'appliquer à tous les inducteurs de mort (Garg et al., 2013a).

Lors du stade tardif de l'apoptose, l'ATP va être libéré de manière passive suite à la

perméabilisation de la membrane plasmique.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 17 : Libération d'ATP (Zitvogel et al., 2010).

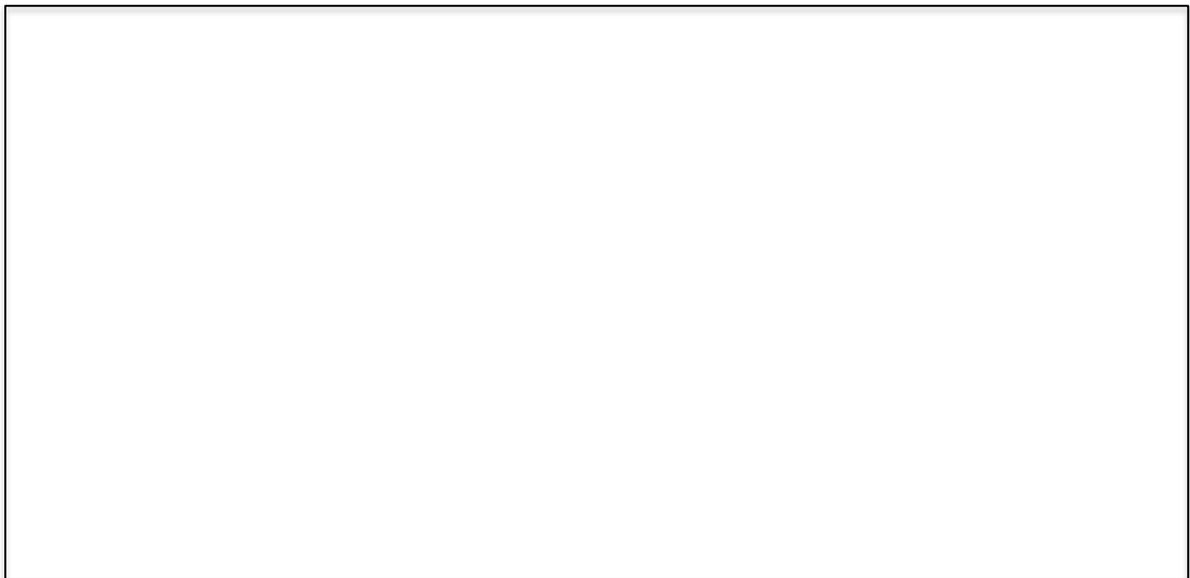
L'ATP libéré par les cellules mourantes se lie au récepteur purinergique P2RX7 à la surface des cellules dendritiques, ce qui active l'inflammasome NLRP3 et stimule la libération de l'IL-1 β , qui va polariser les lymphocytes T CD8 + vers la production d'interféron- γ .

L'ATP extracellulaire agit comme un facteur chimiotactique puissant et favorise non seulement le recrutement des cellules immunitaires au niveau des sites de la mort immunogénique, mais également leur différenciation. Cet effet se fait *via* les récepteurs purinergiques P2RX7 situés à la surface des cellules dendritiques. L'ATP extracellulaire va se lier au récepteur P2RX7 et permettre la formation de l'inflammasome NLRP3, un complexe multi-protéique comprenant NLRP3, la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) et la caspase-1 (**Figure 17**). Une fois activé, ce complexe va induire la sécrétion de l'interleukine 1 β (IL-1 β) et IL-18 par les cellules dendritiques (Aymeric et al., 2010; Ghiringhelli et al., 2009; Riteau et al., 2012; Steer et al., 2006). L'IL-1 β va à son tour stimuler la production d'interféron γ (IFN- γ) par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques de type 1 (Tc1) (Ghiringhelli et al., 2009).

VI. Les vecteurs de transfert en thérapie génique.

Une des étapes clés de la thérapie par gène suicide est le transfert du gène au sein de la tumeur. Le gène doit être exprimé sélectivement et efficacement dans la tumeur. Depuis quelques années, des efforts ont été menés pour développer des vecteurs capables de cibler les cellules cancéreuses spécifiquement. Outre l'efficacité de transfert, il faut aussi tenir compte de la toxicité probable des vecteurs qui doit être suffisamment faible pour ne pas empêcher le succès de la thérapie génique.

Les vecteurs utilisés en GDEPT peuvent être classés en 2 catégories : les vecteurs viraux, les plus utilisés actuellement, et les vecteurs non viraux (**Figure 18**).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 18 : Répartition des vecteurs utilisés en essais cliniques pour la thérapie génique
<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

1. Les vecteurs viraux

Le cycle de vie d'un virus est constitué de deux phases : une première phase d'infection lors de laquelle le virus va pénétrer dans la cellule et une seconde phase de

réplication qui va permettre la synthèse du génome viral ainsi que la production de nouveaux virus.

Le transfert de gène fondé sur les vecteurs viraux exploite la première étape de la réplication des virus : la pénétration et l'expression du gène dans la cellule hôte, et le blocage de la production de virus infectieux. Dans ce contexte, la transduction est définie comme non répllicative. Pour obtenir cela, le génome viral est radicalement réarrangé afin d'éliminer les gènes impliqués dans la réplication et la pathogénicité laissant ainsi de l'espace pour l'insertion de gènes thérapeutiques tels que les gènes suicides. Suite à ces modifications, le virus parental devient un simple vecteur de l'information génétique, d'où le nom de vecteur viral.

Les vecteurs viraux utilisés sont principalement basés sur des virus non réplcatifs, pour des raisons de sécurité, exceptés certains virus tels que les virus oncolytiques, les adénovirus réplcatifs et les virus de la vaccine, qui ne sont utilisés qu'en thérapie génique du cancer.

Les principaux virus utilisés en thérapie gène suicide sont présentés ci-dessous.

1.1 Les Adénovirus

Les adénovirus humains peuvent infecter des cellules en division ou non. Leur génome est épisomal dans les cellules infectées. Il est constitué de cinq gènes dont l'expression est dite précoce (E1 à E5), de deux gènes intermédiaires et de cinq gènes tardifs (L1 à L5). Il ne s'intègre pas dans l'ADN de la cellule hôte, minimisant le risque de mutagenèse insertionnelle. Le génome viral code pour près de 50 protéines virales, dont 11 participent à la structure des virus.

Les adénovirus infectent un grand nombre d'espèces. Chez l'Homme, ils infectent en premier lieu les voies respiratoires et les intestins, causant des maladies respiratoires et gastro-intestinales récurrentes. Les adénovirus sont constitués de plus de 50 sérotypes, dont certains sont très largement répandus tels que les sérotypes 1, 2 et 5. A peu près 80% des personnes saines possèdent des anticorps contre au moins un sérotype dès l'âge de six ans (Davison et al., 2003).

Ces virus ont fait l'objet d'ingénierie progressive au cours de ces dernières années. Dans la première génération des vecteurs adénoviraux, le gène précoce 1A (E1A), qui est un gène régulateur essentiel à la réplication, a été enlevé du génome viral. Comme pour la plupart

des vecteurs viraux, la délétion de gènes cruciaux permet de supprimer la capacité des virus à s'auto-répliquer et en même temps laisse de la place pour l'insertion d'un transgène (Graham and Prevec, 1995). Pour encore plus de sécurité, d'autres gènes ont été supprimés du génome viral, il s'agit des gènes E1B et E3 qui sont impliqués dans la modulation de l'immunité spécifique contre les adénovirus (Campos and Barry, 2007). Ces délétions permettent aux adénovirus d'intégrer de l'ADN avec une taille maximale de 8 Kb (**Tableau 2**). Cependant, les risques de recombinaisons homologues et d'apparition de réponses immunitaires après injection de ces vecteurs sont sources de problèmes (Ahi et al., 2011).

Pour pallier à ces inconvénients, des vecteurs de deuxième génération ont été développés. Deux autres gènes supplémentaires, E4 et E2, ont été supprimés. Ces vecteurs présentent une capacité d'insertion plus grande, passant de 8 à 10 Kb. Une réponse immunitaire moindre a été observée avec ces nouveaux vecteurs. Néanmoins, un autre problème persiste: leur production limitée.

Afin d'éviter l'activation d'une réponse immunitaire cellulaire indésirable, les vecteurs helper-dépendant, (vecteurs-HD) aussi appelés les vecteurs « gutless » ont été développés. Ces derniers sont dépourvus de pratiquement toutes les séquences codantes virales. Seules les séquences utiles à l'encapsidation et à la réplication ont été conservées. L'élimination de l'expression des antigènes de l'adénovirus au sein de ces vecteurs a permis une expression épisodique à plus long terme des transgènes dans les cellules quiescentes. De plus, ces vecteurs ont désormais une plus grande capacité d'insertion d'environ 35 Kb (taille du génome viral) permettant ainsi d'exprimer de grands transgènes.

Avantages	Inconvénients	Modifications apportées
Transduit les cellules quiescentes et en division	Très immunogène	Augmentation de la capacité d'insertion :
Capacité d'insertion jusqu'à 8 Kb	Expression transitoire du transgène	- 10 Kb pour la 2 nd e génération
Fort niveau d'expression du transgène	Immunité préexistante chez l'Homme	- 35 Kb pour la 3 ^{ème} génération
Production du vecteur à hauts titres		Diminution de la réponse immunitaire

Tableau 2 : Avantages, inconvénients et améliorations apportées des vecteurs adénoviraux

1.2 Les "Adeno-associated virus" : AAV

Les « adeno-associated virus » (AAV) sont des virus de petites tailles, icosaédriques, non enveloppés, possédant un génome simple brin. Ils appartiennent à la famille des *Parvoviridae*. Ils nécessitent une co-infection avec un helper virus afin de compléter leur cycle de réplication. A l'origine, l'idée était que les AAV soient dépendants des adénovirus, d'où leur nom. Depuis, il a été démontré que l'herpes simplex virus (HSV) permettait aussi la réplication de l'AAV. Ainsi, l'AAV va pouvoir se répliquer dans des cellules qui ont été activées par co-infection avec un adénovirus, un HSV ou bien un agent génotoxique tel que les UV ou l'hydroxyurée (Yakobson et al., 1989; Yalkinoglu et al., 1988). Un des avantages de l'AAV est qu'il va pouvoir s'insérer dans le génome des cellules cibles. De plus, il a la particularité d'avoir un site spécifique d'insertion *rep*-dépendant localisé dans le chromosome 19 chez l'Homme (Smith, 2008). Le génome des AAV est d'environ 5 Kb. Il est constitué de seulement deux gènes : *rep* pour la réplicase impliquée dans la réplication du génome et *cap* qui code pour les protéines de structure. Les deux gènes sont encadrés par des séquences identiques qui sont des ITRs pour « inverted terminal repeats ».

Les vecteurs AAV ont été dépourvus de leurs deux gènes, *rep* et *cap* tout en conservant les séquences ITRs qui vont entourer le transgène inséré.

Les AAV présentent une faible immunogénicité et sont capables d'infecter des cellules en division et quiescentes, ce qui les rend attractifs en qualité de vecteurs (Giacca and Zacchigna, 2012; Kay et al., 2001). (**Tableau 3**).

Néanmoins, ils présentent aussi certains inconvénients. En effet, ils possèdent une faible capacité de clonage, limitée à 5 Kb, ce qui est très petit pour des gènes thérapeutiques. De plus, une étape de conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin est nécessaire avant toute réplication, ce qui a pour conséquence de « ralentir » l'expression du gène thérapeutique dans la cellule (Coura and Nardi, 2007).

Malgré tous ces inconvénients, les AAV sont utilisés dans un certain nombre de thérapies, à peu près une centaine, traitant essentiellement les maladies monogéniques (Chuah et al., 2012; Grieger and Samulski, 2012; Mendell et al., 2012; Tang et al., 2010).

Avantages	Inconvénients
Transduit les cellules quiescentes et en division	Capacité d'accueil jusqu'à 5 Kb
Virus parental non pathogène	Production du vecteur à hauts titres difficile à atteindre
Tropisme cellulaire étendu	Nécessité d'une co-infection avec un virus helper (adénovirus ou herpes simplex virus)
Possibilité d'intégration site spécifique	
Faible immunogénicité	

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des vecteurs AAV

1.3 Les Poxvirus : Virus de la Vaccine

Les Poxvirus aussi connus sous le nom du virus de la Vaccine, sont des virus enveloppés de grande taille avec un ADN double brin viral d'environ 190 Kb de long. Une caractéristique spécifique aux poxvirus est qu'ils ont un nombre important de gènes, environ 250, qui sont impliqués dans la réplication virale et surtout dans la pathogénicité des virus. Ainsi, de nombreux gènes peuvent être éliminés pour laisser place à un transgène allant jusqu'à 25 Kb. L'autre particularité des poxvirus est que, malgré le fait d'être un virus à ADN, la réplication virale aura lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte, évitant ainsi tout risque d'insertion mutationnelle dans le génome de la cellule hôte (Zeh and Bartlett, 2002).

Les Poxvirus ont un cycle viral de courte durée avec une grande efficacité d'expression du transgène et ils possèdent des propriétés cytolytiques. Ces virus sont capables de transduire pratiquement tous les types cellulaires (Shen and Nemunaitis, 2005). De plus, il a été démontré, *in vivo*, qu'après une administration systémique du virus, celui-ci cible systématiquement les tumeurs (Whitman et al., 1994; Zeh and Bartlett, 2002). Ce tropisme pour les tumeurs serait lié à leur grande taille (> 200 nm). L'idée serait que seuls les vaisseaux non étanches, comme ceux présents dans les tumeurs, peuvent permettre l'extravasation des particules virales (Chang et al., 2005; Peplinski et al., 1996).

Toutes ces spécificités font d'eux de bons vecteurs pour la thérapie génique. Ils sont utilisés pour la production de protéines recombinantes, dans l'immunothérapie des cancers et dans

la vaccination (Gómez et al., 2011; Kim and Gulley, 2012).

Malgré tout cela, les Poxvirus ont été très peu utilisés en thérapie génique à cause d'un problème majeur: leur forte immunogénicité (**Tableau 4**). En effet, ceci joue sur leur efficacité de transduction en facilitant l'élimination des virus et en empêchant toute éventuelle réadministration des vecteurs (Guse et al., 2011).

Les poxvirus les plus développés de nos jours sont très atténués et non répliatifs. Le virus le plus utilisé est l'Orthopoxvirus MVA, pour Modified Vaccina Ankara. Ce dernier présente un profil de sécurité élevé et a été administré à de nombreux animaux et chez l'Homme lors d'une campagne de vaccination contre la variole (Fenner, 1982). D'autres souches sont aussi utilisées dans la recherche tels que : NYVAC, pour New York VACCinia, des avipoxivirus dont ALVAC et TROVAC qui proviennent respectivement des virus canarypox et fomlpox (Vannucci et al., 2013a).

Les données actuelles suggèrent que les virus oncolytiques sont plus efficaces, en tant que vecteur, quand ils sont recombinaés avec des gènes suicides (Hermiston and Kuhn, 2002). L'équipe du Dr Erbs a travaillé avec le poxvirus MVA exprimant le gène suicide cytosine désaminase couplée à l'UPRT dans un modèle du cancer du côlon. Ils ont mis en évidence la présence d'un effet "by-stander", *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une activité anti-tumorale. De plus, ils ont démontré que le poxvirus était plus efficace qu'un adénovirus (Erbs et al., 2008).

Avantages	Inconvénients
Multiple sites d'insertion du transgène	Potentiellement cytotoxique
Particulièrement apte en tant que vaccin recombinant atténué	Expression transitoire du transgène
Capacité d'insertion jusqu'à 30 Kb	Génération de vecteurs recombinants difficile
Bien adapté en tant que vecteurs oncolytiques	Très immunogène
	Utilisation de promoteur hétérologue difficile à réaliser

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des vecteurs issus des poxvirus

1.4 Les Rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés avec une capsidie contenant deux copies d'ARN sens simple brin d'environ 10 Kb. Le génome des rétrovirus présente deux séquences de LTRs pour « Long Terminal Repeats » aux extrémités 5' et 3'. Ces LTRs englobent trois protéines qui sont *gag*, *pol* et *env*. Le gène *gag* code pour les protéines de structure constituant la capsidie. Le gène *pol* code pour les enzymes impliquées dans la réplication (rétrotranscription, intégration et protéolyse virale) et le gène *env* pour les glycoprotéines présentes dans l'enveloppe du virus. Ces trois gènes sont régulés par les LTRs qui agissent comme des promoteurs.

Le cycle viral des rétrovirus se déroule de la manière suivante : une fois la capsidie à l'intérieur de la cellule hôte, le génome viral est converti en double brin d'ADN avec l'aide d'une reverse transcriptase. Par la suite, l'ADN va être transporté jusqu'au noyau où il va pouvoir intégrer le génome de la cellule hôte. L'intégration de l'ADN est permanente mais se fait de manière aléatoire (Wu and Burgess, 2004). Cette caractéristique est un avantage important mais peut aussi être un problème en terme de sécurité (**Tableau 5**) (Vannucci et al., 2013b).

En effet, un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'utilisation de rétrovirus au cours d'essais cliniques est l'insertion du gène thérapeutique à proximité de proto-oncogène. Cela a été observé il y a quelques années, lors d'un essai clinique mené sur des enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DICS-X). En effet, neuf enfants ont reçu des injections de cellules souches transduites avec un rétrovirus recombiné codant pour le gène Gamma c (γc) fonctionnel. Sur ces neuf enfants, sept ont retrouvé un système immunitaire fonctionnel. Quatre d'entre eux ont développé une leucémie à la suite de la thérapie génique dont un enfant qui est décédé. Cette grave complication est la conséquence d'une mauvaise insertion du rétrovirus au sein des cellules souches (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Néanmoins, une alternative au rétrovirus a permis d'éradiquer les risques d'insertion mutationnelle rencontrées, le choix s'est porté sur les lentivirus (Hacein-Bey Abina et al., 2015).

Une autre caractéristique des rétrovirus est qu'ils ne peuvent infecter que des cellules en division (Yamashita and Emerman, 2006). En effet, le rétrovirus étant dépourvu du complexe de pré-intégration permettant le transfert de l'ADN viral jusqu'au noyau,

l'intégration du génome viral ne va pouvoir se faire que durant la période de mitose des cellules hôtes au cours de laquelle la membrane nucléaire se dissout laissant ainsi libre accès à l'ADN de la cellule.

Avantages	Inconvénients
Intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte	Transduction uniquement des cellules en division
Capacité d'insertion jusqu'à 8 Kb	Ciblage cellulaire difficile à réaliser
Tropisme cellulaire étendu	Intégration aléatoire du génome viral
Faible immunogénicité	Risque élevé d'insertion mutationnelle
Faible immunité préexistante chez l'Homme	Faible stabilité
Production du vecteur à de hauts titres	

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des vecteurs rétroviraux

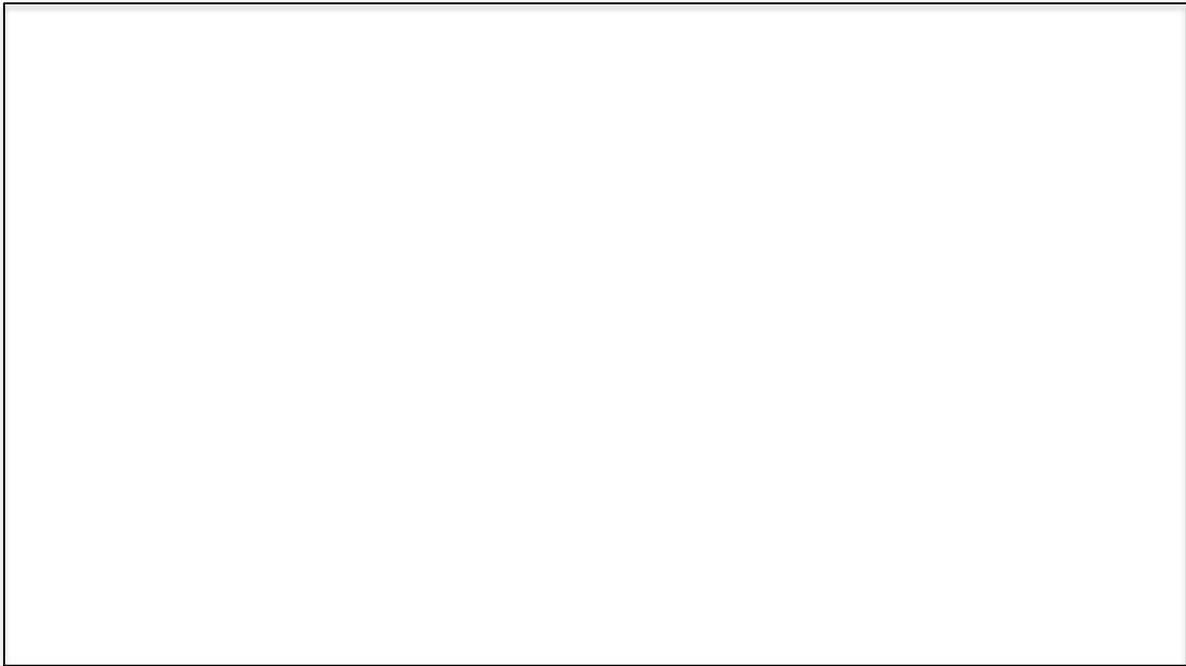
1.5 Les Lentivirus

Les lentivirus sont des virus enveloppés contenant un génome ARN sens double brin d'environ 10 Kb. Ils appartiennent à la famille des rétrovirus cependant ils sont considérés comme des rétrovirus avancés et plus complexes car le génome des lentivirus exprime plusieurs gènes régulateurs en plus de ceux en commun avec le génome des rétrovirus. Ces gènes sont impliqués dans différentes fonctions telles que la régulation de la réplication virale, la neutralisation des défenses des cellules hôtes et l'atténuation de la réponse immunitaire. Parmi les gènes régulateurs de la réplication virale, certains vont coder pour des protéines qui vont former le complexe de pré-intégration dans la cellule hôte afin de faciliter l'entrée du génome viral rétro-transcrit en ADNc dans le noyau des cellules quiescentes (Bukrinsky and Haffar, 1999; Freed, 2001). Cette propriété est un avantage par rapport aux rétrovirus qui ne peuvent infecter que les cellules en division.

Les lentivirus les plus utilisés sont ceux issus du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il existe d'autres souches de lentivirus provenant d'autres espèces animales tels que le virus de l'immunodéficience simienne (VIS ou SIV en anglais), féline (VIF ou FIV en anglais), équine (VIE ou EIAV en anglais) et bovine (VIB ou BIV en anglais) (Curran et al., 2000; Kenyon and Lever, 2011; Pistello et al., 2007; Poeschla et al., 1998; Valori et al., 2008).

Ils ont une capacité d'insertion allant jusqu'à 9 Kb et présentent un faible risque de mutagenèse insertionnelle ainsi qu'une faible oncogénicité, car ils ont tendance à s'insérer à distance des promoteurs cellulaires (Cereseto and Giacca, 2004; Ciuffi, 2008). Un autre avantage des lentivirus est l'absence d'une immunité préexistante dans la population humaine. Par ailleurs, les lentivirus non humains présentent un autre avantage : Ils sont non pathogènes pour l'Homme, tout en étant capables de transduire des cellules humaines (**Tableau 6**).

Le lentivirus issu du VIH a subi plusieurs modifications au cours des dernières années dans le but de diminuer les risques de recombinaison et de génération de virus capables de se répliquer. Trois générations de lentivirus ont vu le jour. La première génération de vecteurs présente une importante délétion des séquences virales, exceptés les gènes nécessaires à l'exportation du vecteur ainsi qu'à l'ARNm viral non épissé du noyau au cytoplasme (Freed, 2001). La deuxième génération de vecteur est caractérisée par la suppression d'autres gènes régulateurs non essentiels à la production du virus. Pour finir, la troisième génération apporte des changements cruciaux dont le remplacement de la séquence 5' LTR par des promoteurs viraux. Ainsi, l'expression du génome viral n'est plus sous le contrôle des LTRs mais sous le contrôle de la cellule hôte. Dans ce contexte, le vecteur est appelé SIN pour « Self inactivating ». De plus, l'ajout de séquences codantes cPPT (central Poly-Purine Tract) permet d'augmenter l'efficacité d'encapsidation du vecteur (**Figure 19**).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 19: Représentation schématiques du vecteur Lentiviral (Sakuma et al., 2012).

(A) La première génération de lentivirus inclut toutes les protéines virales exceptées la protéine Env dans le plasmide de structure (Packaging plasmid). VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein) est fournie par un autre plasmide. Le plasmide, contenant le génome du vecteur, contient les LTRs et le transgène qui est exprimé sous le contrôle d'un puissant promoteur viral tel que CMV (CytoMégaloVirus). (B) Pour la seconde génération de vecteurs VIH, toutes les protéines régulatrices sont exclues du plasmide de structure. Similaire à la première génération de vecteurs du VIH, l'expression des glycoprotéines et du transgène est réalisée par différents plasmides. (C) La troisième génération de vecteur VIH requiert quatre plasmides différents. En plus des trois plasmides : Structure, Enveloppe et génome viral, la protéine Rev est fournie par un autre plasmide. Au niveau du « vector plasmid », toute la région U3 en 5' du génome a été enlevée et remplacée par un promoteur viral tel que RSV ou CMV pour l'expression du génome viral.

Actuellement, d'autres stratégies d'amélioration du vecteur sont en développement. La première étant l'utilisation de vecteurs lentiviraux non-intégratifs. Ces derniers permettent d'avoir les avantages du lentivirus tout en évitant d'avoir une intégration dans le génome de la cellule hôte, évitant ainsi tout risque d'insertion mutationnelle et permettant une expression transitoire du transgène dans les cellules. Pour cela, l'intégrase, qui est l'enzyme qui participe à l'intégration du transgène dans le génome de la cellule hôte, est inactivée (Negri et al., 2011; Staunstrup and Mikkelsen, 2011).

La seconde stratégie est le développement de vecteurs inductibles. Ces vecteurs possèdent des promoteurs dont l'activité va dépendre de la présence d'un médicament ou bien d'une

molécule spécifique. Ainsi, en présence de cette molécule, les promoteurs seront actifs et vont permettre l'expression contrôlée et temporaire du transgène. En absence de la molécule, ce dernier ne sera pas exprimé (Osten et al., 2007).

La principale contrainte de ces stratégies est la difficulté de construire des vecteurs avec un bon rendement.

Avantages	Inconvénients
Transduit les cellules quiescentes et en division	Possible insertion mutationnelle
Intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte	Nécessité des protéines régulatrices (<i>tat, rev et autres</i>) pour la production du vecteur
Capacité d'insertion jusqu'à 9 Kb	Expression transitoire du transgène avec les vecteurs non intégratifs
Expression prolongée du transgène	
Possibilité de développer des vecteurs non intégratifs	

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des vecteurs lentiviraux

Au cours de mes travaux de recherche, nous avons eu recours à l'utilisation de lentivirus comme vecteurs intégratifs de dernière génération utilisant le promoteur non viral E1F α (Elongation Factor (EF)-1 α) long. Notre lentivirus est pseudotypé avec la glycoprotéine membranaire VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein).

2. Les vecteurs non viraux

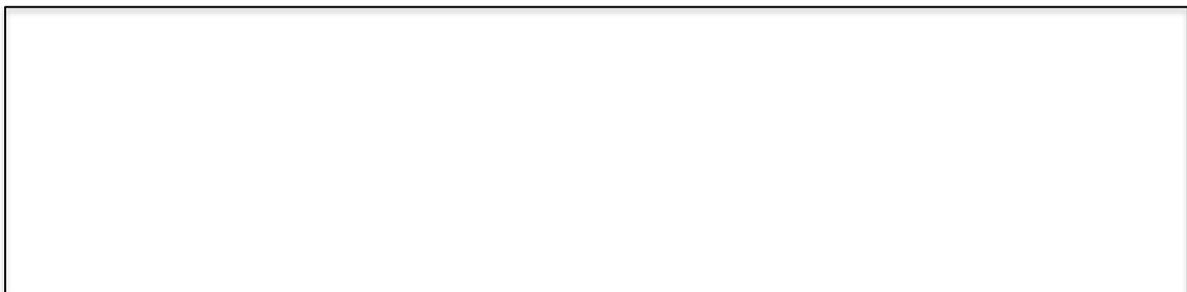
Les vecteurs viraux sont les vecteurs les plus utilisés en thérapie génique. Néanmoins, ils présentent plusieurs inconvénients dont la carcinogénèse potentielle (Baum et al., 2006), l'immunogénicité (Bessis et al., 2004), la limitation de la capacité d'insertion (Thomas et al., 2003) ainsi que les difficultés de production (Bouard et al., 2009).

L'utilisation des vecteurs non viraux en thérapie génique est en pleine émergence depuis quelques années. L'intérêt de ces vecteurs est qu'ils présentent une très faible immunogénicité par rapport aux virus, qu'ils ne sont pas limités en terme de taille du

génomique à transporter et qu'ils sont plus faciles à produire que les virus (Mintzer and Simanek, 2009; Pack et al., 2005). Cependant, globalement, ces vecteurs non viraux sont moins efficaces que les virus en terme de transfert de gène. Toutefois, quelques-uns de ces vecteurs ont pu être développés en clinique.

2.1. Les liposomes

Les liposomes font partie des vecteurs non viraux les plus largement utilisés en thérapie génique. Ce sont des vésicules artificielles formées par des bicouches phospholipidiques mesurant quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Leur association avec l'ADN se fait par interactions électrostatiques entre les groupes phosphates de l'ADN chargés négativement et les têtes polaires des lipides cationiques chargés positivement. Les liposomes, ainsi que d'autres vecteurs non viraux, pénètrent dans la cellule par endocytose. Une fois dans le cytoplasme, le liposome va se dissocier et va libérer l'ADN (**Figure 20**).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 20 : Vecteurs Lipidiques (Kreiss and Scherman, 1999)

C'est en 1980 qu'il a été montré pour la première fois que des liposomes composés de phosphatidylsérine pouvaient encapsuler et transporter l'ADN du virus simien 40 (SV40) à des cellules rénales de singe (Fraley et al., 1980). Quelques années plus tard, une autre étude a permis d'améliorer l'efficacité de transfection en utilisant un lipide cationique synthétique, DOTMA. Ce dernier était capable d'encapsuler et de transférer de l'ADN à différentes lignées cellulaires (Felgner et al., 1987).

Les lipides cationiques présentent eux aussi des limites qui sont une faible efficacité de transfection due à une mauvaise stabilité ainsi que le développement d'une réponse inflammatoire. De nombreuses études tentent d'améliorer l'efficacité de transfection tout en réduisant la toxicité des lipides cationiques (He et al., 2013). Des essais cliniques menés sur l'utilisation des lipoplexes (liposomes + ADN) dans le traitement des cancers sont en cours. Une étude de phase I de thérapie génique contre différents types de cancers utilisant des lipides cationiques transportant les gènes humains HLA-A2, HLA-B13 et le gène murin H-2K a eu lieu. Cette étude a permis de montrer qu'une forte réponse immunitaire s'est développée localement après l'injection *in situ* des lipoplexes, sans présenter d'autres effets secondaires. De plus, 2 patients sur les 8 présents ont montré une régression complète des nodules cutanés (Hui et al., 1997).

2.2 Les polymères cationiques

Les polymères cationiques constituent une autre classe des vecteurs non viraux. Ils sont attractifs par leur grande diversité chimique et leur potentiel de fonctionnalisation. Les principaux polymères utilisés en thérapie génique sont la poly(L-lysine) (PLL) et le polyéthylénimine (PEI). Tout comme les liposomes, les polymères vont s'associer à l'ADN par des interactions électrostatiques qui vont déclencher un processus de coopérativité formant des particules appelées polyplexes.

La poly(L-lysine) (PLL) est un polypeptide synthétique de lysine (**Figure 21**). Sa capacité à condenser l'ADN est connue depuis les années 1960 (Laemmli, 1975; Olins et al., 1967). Néanmoins, la PLL présente un faible niveau de transfection (Mintzer and Simanek, 2009). Dans le but d'améliorer l'efficacité de transfert de la PLL, des modifications structurelles ont été réalisées. En effet, l'ajout de PEG, polyéthylène glycol, à la PLL va permettre de diminuer les interactions non spécifiques avec les protéines présentes dans le

sérum et ainsi va prolonger la durée de circulation dans le sang (Kano et al., 2011).

Le polyéthylénimine (PEI) fait partie des vecteurs non viraux les plus étudiés et les plus utilisés en thérapie génique. Le PEI possède une structure chimique particulière : un atome sur trois est un atome d'azote qui participe à un groupement amine protonable (**Figure 21**). Cette structure lui confère une forte densité de charge qui facilite la condensation de l'ADN et l'échappement endosomal. L'efficacité du transfert de gène par le PEI a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* pour la première fois en 1995 (Boussif et al., 1995). Les PEI présentent deux topologies distinctes : linéaire et ramifiée, et peuvent être de différents poids moléculaires allant de 423 Da à 800 KDa. La toxicité ainsi que l'efficacité du PEI est totalement dépendante du poids moléculaire et de la structure de ce dernier (Godbey et al., 1999; Wightman et al., 2001). Ainsi, un PEI avec un faible poids moléculaire va être peu efficace et moins toxique qu'un PEI avec un haut poids moléculaire qui lui sera très efficace en transfection de gènes mais qui aura une forte toxicité (Lv et al., 2006). Actuellement, le PEI est utilisé dans plusieurs essais cliniques. En effet, un essai clinique de phase I a été mené sur des patients atteints d'un cancer du pancréas qui ont été traités par CYL-02 : ADN plasmidique codant pour la DCK :: UMK et complexé avec un PEI linéaire. Cette étude a démontré l'innocuité du vecteur. Sur les 22 patients traités 9 ont présenté une stabilité de la croissance tumorale jusqu'à 6 mois après le traitement et 2 ont montré une amélioration de la survie (Buscail et al., 2015a).

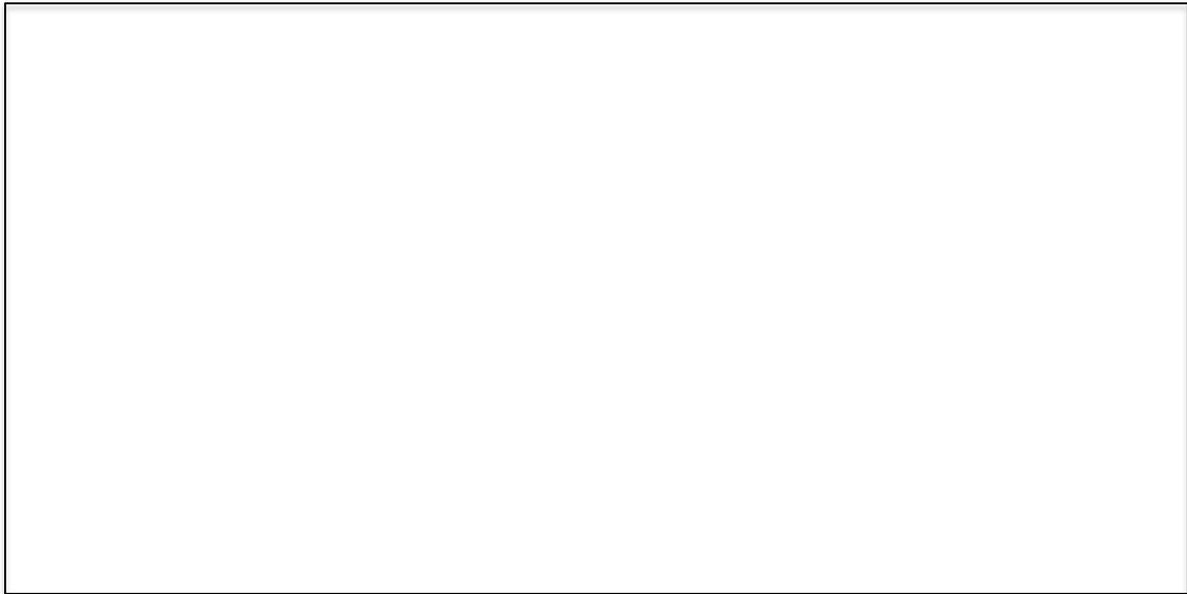


En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 21 : Structure moléculaires de la Poly(L-lysine) (PLL) et de la Poly(éthylèneime) (PEI)

2.3 Les bactéries

Un grand nombre de souches bactériennes présentent un tropisme pour les tumeurs (Lin et al., 2015). Parmi ces souches bactériennes, on retrouve le *Clostridium* et le *Bifidobacterium* qui sont anaérobies, ainsi que la *Salmonella* et la *Listeria* qui sont anaérobies facultatives. Au départ, l'idée principale était que le microenvironnement hypoxique présent dans les zones nécrotiques des tumeurs était à l'origine de leur tropisme tumoral. Actuellement, des études ont démontré que d'autres caractéristiques du microenvironnement tumoral seraient aussi impliquées dans la colonisation des tumeurs par des bactéries (Kasinskas and Forbes, 2007) (**Figure 22**).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 22 : Ciblage tumoral par des vecteurs bactériens (Lin et al., 2015).

(I) Le microenvironnement hypoxique dans les zones nécrotiques des tumeurs solides, favorise la colonisation et la prolifération des bactéries anaérobies facultatives et/ou obligatoires. (II) Augmentation du piégeage dans la vascularisation désorganisée et non étanche, causée par la néo-angiogenèse; (III) les composés chimio-attracteurs présents dans les zones nécrotiques (par exemple, l'aspartate, la sérine, le citrate, le ribose ou le galactose) permettent aux bactéries de se diriger vers les tumeurs; (IV), La clairance des bactéries est compromise en raison de la présence de cellules myéloïdes suppressives et de l'accumulation des ligands de récepteurs immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral. Ces deux phénomènes vont inactiver les cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des bactéries.

Plusieurs études pré-cliniques et cliniques ont démontré que le transfert de gènes à l'aide de bactéries dans la thérapie du gène suicide est possible. Une des premières études a été menée sur la combinaison HSV-TK et le ganciclovir. L'injection de *S. Typhimurium* exprimant le gène d'HSV-TK dans un modèle de mélanome chez la souris suivie d'un traitement au Ganciclovir a permis un ralentissement de la croissance tumorale ainsi qu'un prolongement de la survie des souris (Pawelek et al., 1997). D'autres combinaisons enzyme/pro-drogue sont testées telles que la cytosine désaminase bactérienne / 5-FC (Fox et al., 1996; Mei et al., 2002; Mengesha et al., 2010; Nakamura et al., 2002), ou la nitroréductase / CB1954 (Lemmon et al., 1997; Prosser et al., 2010, 2013; Theys et al., 2006). Mei et al., ont démontré qu'après une injection intraveineuse de *Salmonella typhimurium* exprimant la cytosine désaminase chez des rats ayant des tumeurs, celles-ci sont détectées

principalement au niveau des tumeurs. Theys et al., ont mis en évidence l'efficacité anti-tumorale d'injections intraveineuses répétées de *Clostridium* exprimant la NTR chez des souris nudes.

Un essai de phase I utilisant les *S. Typhimurium* exprimant la cytosine désaminase bactérienne sur des patients atteints de tumeurs solides réfractaires à tout traitement a démontré l'innocuité du vecteur ainsi que l'existence d'un effet anti-tumoral visible chez 2 patients sur 3 (Nemunaitis et al., 2003a).

3. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC): les nouveaux vecteurs appliqués en thérapie gène suicide

Un des facteurs clés de la thérapie par gène suicide est le transfert de gène au sein de la tumeur. En plus d'être important pour l'efficacité de la stratégie, il est tout aussi limitant pour celle-ci. De nombreuses études se sont focalisées sur l'amélioration des vecteurs viraux ou non. Néanmoins, il n'existe toujours pas de vecteur « idéal » capable de cibler spécifiquement les cellules tumorales avec une efficacité de transduction élevée.

Dans le but de résoudre ce problème, un nouveau type de vecteur est en pleine émergence : les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules possèdent un tropisme tumoral, ce qui en fait un outil potentiel pour la thérapie génique.

3.1 Les cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée se caractérisant par la capacité à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et une capacité à se maintenir par prolifération dans l'organisme ou, indéfiniment, en culture (auto renouvellement). Elles sont présentes chez tous les êtres vivants multicellulaires.

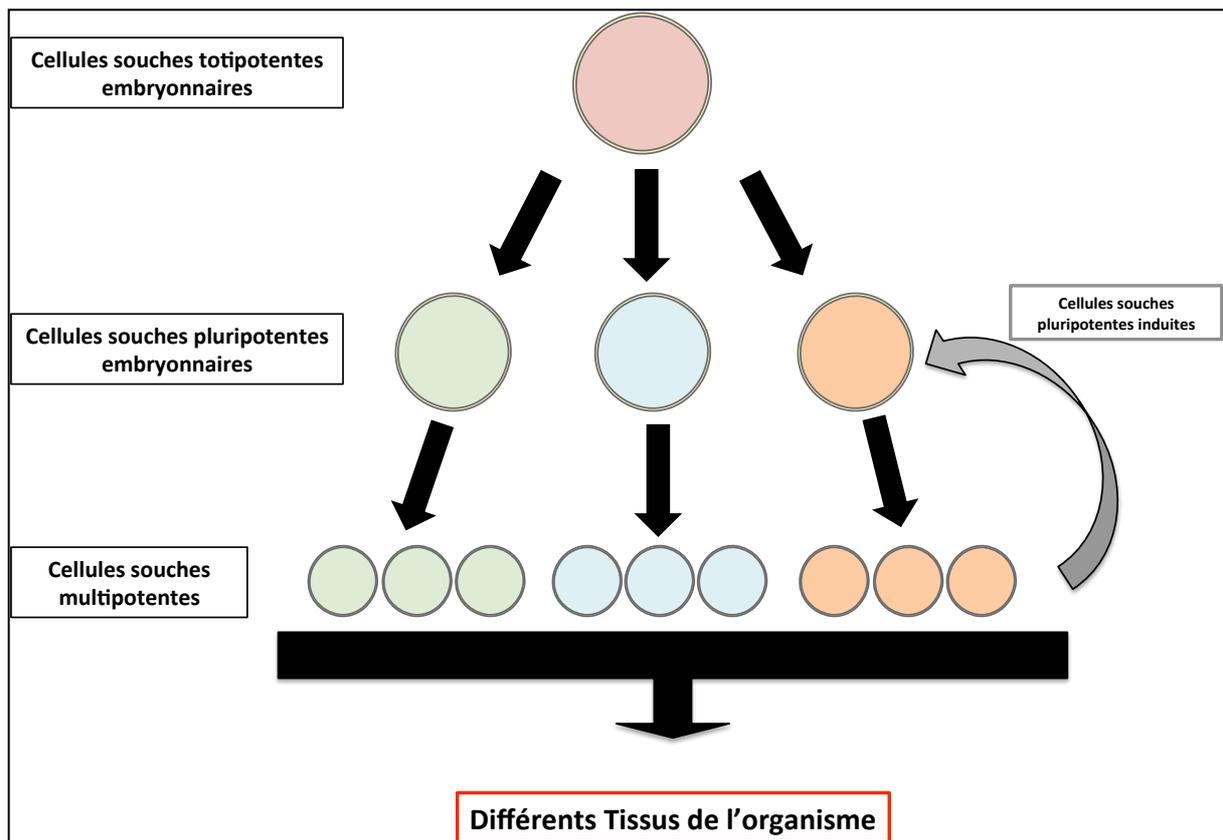


Figure 23 : Classification des cellules souches

Ces cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation. Il existe quatre catégories de cellules souches (**Figure 23**) :

- Les cellules souches **totipotentes** ont la capacité de pouvoir donner les 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) et les annexes embryonnaires (placenta, cordon ombilical). Ces cellules sont les seules à permettre le développement d'un individu complet, de l'ovule fécondé en passant par les cellules issues des premières divisions de cet œuf jusqu'au stade morula.

- Les cellules souches **pluripotentes** sont issues de la différenciation des cellules souches totipotentes. Elles sont capables de former les 3 feuillets embryonnaires, tout comme les totipotentes, mais elles ne peuvent conduire à la formation d'un organisme entier. Parmi ces cellules souches, il y a les cellules souches embryonnaires (ES) au stade blastocyste et les cellules souches pluripotentes induites (IPS) qui proviennent de la dédifférenciation *in vitro* de cellules matures (ex : fibroblastes).

- Les cellules souches **multipotentes** proviennent, à leur tour, de la différenciation des cellules souches pluripotentes. Elles ont la capacité de pouvoir se différencier en

différents types cellulaires spécifiques d'un tissu. Parmi ces cellules souches multipotentes, on retrouve les cellules souches hématopoïétiques (HSC), les cellules souches neuronales (NSC) et les cellules souches mésenchymateuses (MSC).

- Les cellules souches **unipotentes** sont plus encore engagées dans un processus de différenciation qui ne leur permet de produire qu'un type cellulaire. Elles sont considérées comme cellule souche car elles conservent la propriété d'auto-renouvellement.

3.1.1 Les cellules souches embryonnaires (ES)

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes. Elles sont capables de se diviser indéfiniment et de se différencier pour former les cellules constituant les trois feuillets embryonnaires à la fois *in vitro* et *in vivo* (Takahashi et al., 2007a; Thomson et al., 1998). Durant le développement embryonnaire, les cellules souches sont présentes de manière transitoire car elles sont rapidement différenciées en différents types de cellules somatiques. Ces cellules sont isolées *ex vivo* à partir de l'amas cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste. Les cellules souches proviennent d'embryons surnuméraires issus de la procréation médicalement assistée, fécondation *in vitro*, pour lesquels aucun projet parental n'a été maintenu par le couple. Les cellules souches embryonnaires peuvent aussi être obtenues à partir d'un clonage thérapeutique. Ce dernier consiste à prélever un noyau d'une cellule d'un patient, puis de l'introduire dans le cytoplasme d'un ovocyte dont le noyau a été préalablement enlevé. Ainsi, le cytoplasme de l'ovocyte apportera les informations nécessaires pour déclencher le processus de la blastogenèse et le matériel génétique sera apporté par le noyau introduit.

Les cellules souches embryonnaires ont la capacité de renouveler et de maintenir leur potentiel de développement même après une longue phase de prolifération sans différenciation (Amit et al., 2000). Ces cellules peuvent donner lieu aux lignées extra-embryonnaires tels que le trophoblaste et les cellules ectodermiques primitives (Pera et al., 2004; Thomson et al., 1998). Ces cellules expriment des facteurs de transcriptions qui jouent un rôle clé dans la maintenance de leur caractère pluripotent. Parmi ces facteurs, on retrouve OCT4 « OCTamer-binding Transcription factor 4 » un facteur appartenant à la famille des protéines POU (acronyme de Pit-1 Oct-1 Unc-86), NANOG une protéine de liaison à l'ADN et SOX2 un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines SOX

(Avilion et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Okamoto et al., 1990).

La manipulation et l'expansion *in vitro* des cellules souches embryonnaires offre une opportunité unique d'étudier les étapes précoces du développement chez l'Homme (Jongkamonwiwat and Noisa, 2013; Pera and Trounson, 2004). Il a été démontré que la différenciation des cellules souches en culture utilise les mêmes facteurs impliqués dans la régulation du développement embryonnaire lors de la génération des souches germinales (Noisa et al., 2014). De plus, du fait de la difficulté à accéder aux embryons précoces humains, les cellules souches embryonnaires semblent être un bon modèle pour comprendre la signalisation complexe qui a lieu chez l'embryon humain.

La première étude à avoir démontré le potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires date de 1998. Lors de cette étude, ces cellules souches mises en culture ont réussi à se différencier en plusieurs types cellulaires : la peau, les neurones, les cellules cardiaques, musculaires et bien d'autres encore (Thomson et al., 1998). Dans une autre étude, des chercheurs ont réussi à développer des précurseurs neuraux à partir de cellules souches embryonnaires. Ces précurseurs neuraux ont pu se développer *in vitro* en neurones matures, en astrocytes et en oligodendrocytes (Reubinoff et al., 2001).

Les cellules souches embryonnaires fournissent une alternative à différentes applications dans la recherche fondamentale mais aussi dans la pharmacologie. En effet, les cellules souches peuvent être utilisées pour le « screening » de médicaments candidats et de molécules carcinogènes ou toxiques, qui ne peuvent être analysés directement chez l'embryon humain (Prajumwongs et al., 2016). Ces cellules sont très intéressantes pour identifier les médicaments qui pourraient interférer au cours de la grossesse sur l'embryon en développement. Néanmoins, l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pose de nombreux problèmes éthiques impliquant le développement, l'usage et la destruction d'embryons humains.

Pour surmonter ces problèmes éthiques, des alternatives existent comme l'utilisation de cellules souches adultes ou bien dans le but de conserver la pluripotence l'utilisation des cellules IPS, « induced pluripotent stem cells ».

3.1.2 Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes sont indifférenciées et sont présentes dans un organe ou

un tissu parmi les cellules différenciées. Ces cellules sont capables de se renouveler et peuvent se différencier pour donner une partie ou la totalité des cellules spécialisées d'un tissu ou d'un organe. Ainsi, la fonction primaire des cellules souches adultes est de maintenir et de réparer le tissu duquel elles sont originaires. Les cellules souches adultes sont présentes dans un grand nombre de tissus et organes dont le cerveau, la moelle osseuse, le sang périphérique, les muscles squelettiques, la peau, le cœur, les dents, l'intestin, le foie et bien d'autres (Barker et al., 2008; Blanpain et al., 2007; Nakada et al., 2011; Pinnamaneni and Funderburgh, 2012). Elles sont localisées dans une région spécifique du tissu appelée la niche des cellules souches. Dans la plupart des cas, les cellules souches adultes sont considérées comme des péricytes qui sont des cellules qui composent la couche la plus externe des petits vaisseaux sanguins (Bexell et al., 2009; Bianco, 2014). Les cellules souches peuvent rester quiescentes pendant de longues périodes jusqu'à ce qu'elles soient activées pour maintenir les tissus ou pour réparer une lésion (He et al., 2009).

La découverte des cellules souches adultes date des années 60 (McCulloch and Till, 1964). Des chercheurs ont démontré que la moelle osseuse contenait au moins deux types de cellules souches (Friedenstein et al., 1968a). La première population est appelée **cellules souches hématopoïétiques**. Elles sont les précurseurs de tous les types de cellules sanguines dans le corps : les globules rouges, les lymphocytes B et T, les cellules NK (neutral killer), les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes et les macrophages....

La seconde population est appelée cellules souches stromales de la moelle osseuse (en anglais « bone marrow stromal cells ») ou bien nommées **cellules souches mésenchymateuses (MSC)**. Elles constituent une faible proportion de la population stromale dans la moelle osseuse. Ces cellules sont aussi retrouvées au niveau du tissu adipeux (Bourin et al., 2013). Les MSC sont aptes à générer les cellules du cartilage (chondrocytes), les cellules osseuses (ostoblastes et ostéocytes) et les cellules graisseuses (adipocytes).

Un grand nombre d'études ont mis en évidence que certaines cellules souches adultes pouvaient se différencier en un type cellulaire différent de leur tissu d'origine. Ce phénomène est connu sous le nom de transdifférenciation (Abderrahim-Ferkoune et al., 2004).

Une autre caractéristique des cellules souches adultes est la reprogrammation d'une cellule souche en d'autres types cellulaires qui ont été détruites ou endommagées par une maladie (Trounson et al., 2011).

Elles présentent des inconvénients en comparaison aux cellules souches embryonnaires. En effet, leur faible nombre dans les tissus matures rend leur isolation et leur culture plus compliquées. Néanmoins, les cellules souches adultes ne posent pas de problèmes d'éthique contrairement aux cellules embryonnaires.

3.1.3 Les "Induced-pluripotent stem (iPS) cells"

Les « induced-pluripotent stem (iPS) cells » sont des cellules adultes qui ont été reprogrammées génétiquement en cellules souches en réactivant l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Les premières cellules iPS ont été générées à partir de fibroblastes embryonnaires de souris transduites à l'aide d'un rétrovirus recombinant et exprimant les quatre facteurs de transcription suivant : Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). La même équipe a réussi à développer des cellules iPS humaines à partir de fibroblastes dermiques humains (Takahashi et al., 2007b) <http://www.medecinesciences.org/fr/component/content/article?id=382>. Ces iPS présentent les caractéristiques spécifiques des cellules souches pluripotentes telles que : la disparition de Thy1, un marqueur de surface présent chez les cellules différenciées ; l'apparition de SSEA-1, qui est exprimée à la surface des cellules souches embryonnaires et la réactivation de gènes endogènes dont Oct4, Sox2 et la télomérase (Stadtfield et al., 2008). Une des modifications cruciales de la reprogrammation est la réactivation du chromosome X silencieux. Cette étape a lieu dans les derniers stades de la reprogrammation et constitue une caractéristique de l'état fondamental des cellules souches pluripotentes (Maherali et al., 2007; Payer et al., 2011; Stadtfield et al., 2008). Elles sont capables de donner les différents feuillets embryonnaires.

Par ailleurs, plusieurs méthodes ont été développées pour reprogrammer les cellules somatiques en cellules iPS, chacune d'entre elles présentant des avantages et des inconvénients (Robinton and Daley, 2012). Les virus sont couramment utilisés pour introduire les facteurs de reprogrammation dans les cellules somatiques. Ce procédé doit être soigneusement contrôlé et testé avant tout essai chez l'Homme.

Les cellules iPS représentent une alternative aux cellules souches embryonnaires (ES). En effet, les cellules iPS et ES sont identiques et présentent les mêmes caractéristiques fonctionnelles (**Tableau 7**). Toutefois, des disparités sont observées au niveau de leur

potentiel de différenciation. Certaines cellules iPS murines montrent une plus faible efficacité de formation de tératomes que les cellules ES murines. La même chose est observée chez les cellules iPS humaines qui ont moins tendance à se différencier en cellules hématopoïétiques, neuro-épithéliales et neuronales que les cellules ES humaines (Feng et al., 2010; Hu et al., 2010; Miura et al., 2009). Ces différences observées peuvent s'expliquer par le fait que les cellules iPS possèderaient une plus faible capacité de différenciation que les cellules ES (Feng et al., 2010). Une autre explication est que l'origine cellulaire des cellules reprogrammées iPS pourrait influencer la capacité de différenciation des iPS (Kim et al., 2010).

En conclusion, les cellules iPS possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires sans présenter les problèmes éthiques rencontrés avec ces dernières.

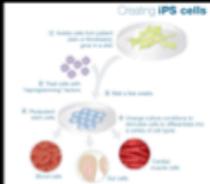
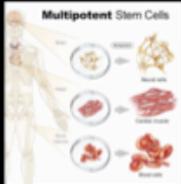
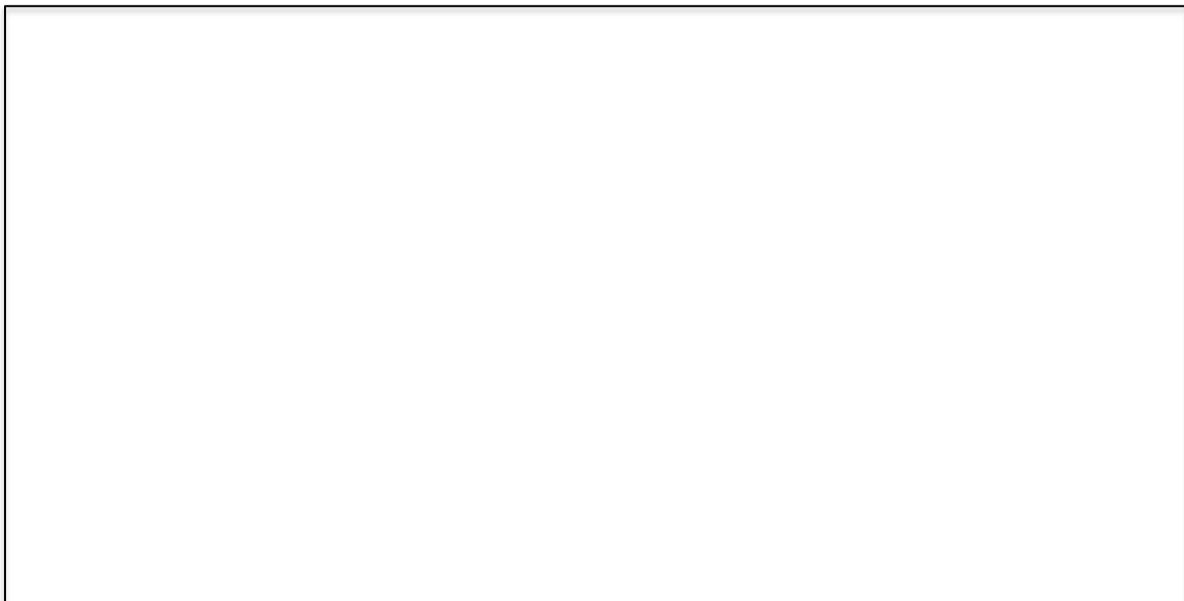
	Cellules souches embryonnaires (ES)	Cellules souches pluripotentes induites	Cellules souches adultes
Caractéristiques			
Prolifération <i>in vitro</i>	Très importante	Très importante	Limitée
Potence	Pluripotentes	Pluripotentes	Multipotentes
Tumorigénicité	Possible	Possible	Non
Problèmes Ethique	Oui	Non	Non

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques des cellules souches

3.2 Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

La découverte des cellules souches mésenchymateuses remonte à plus de 130 ans par le pathologiste Coheim qui a mis en évidence l'existence de cellules souches non hématopoïétiques (Prockop, 1997). Coheim suggérait que ces cellules pouvaient contribuer

à la cicatrisation des plaies, car elles pouvaient être une source de fibroblastes. Les cellules souches mésenchymateuses furent ensuite caractérisées par Friedenstein dans les années 1960. Friedenstein identifia les cellules souches humaines et les décrivit comme des cellules adhérentes, clonogéniques, de type fibroblastiques (Friedenstein, 1980; Friedenstein et al., 1966, 1968b, 1970, 1974a, 1974b, 1976). Ces cellules possèdent la capacité de donner naissance à des colonies fibroblastiques ce qui leur confèrent le nom de F-CFU (Fibroblast-Colony Forming Units) (Friedenstein et al., 1970). En outre, elles ont le potentiel de se différencier en chondrocytes, adipocytes, myoblastes et ostéoblastes (**Figure 24**) (Bianco et al., 2008; Caplan, 2007; Kolf et al., 2007; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Elles acquièrent leur nom de cellules souches mésenchymateuses seulement au début des années 1990 par Arnold Caplan (Caplan, 1991). Le terme, mésenchyme, est dérivé du grec méso signifiant "intermédiaire" et -enchyme signifiant «infusion» et fait référence à la capacité des cellules mésenchymateuses à se propager et migrer dans le développement embryonnaire précoce au niveau de la couche mésodermique (Caplan, 1991). Ces cellules sont aussi connues sous le nom de cellules stromales mésenchymateuses.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 24 : Le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Meregalli et al., 2011). Les MSC peuvent se différencier en une grande variété de tissus humains dont les lignées ostéogéniques, chondrogéniques, adipocytaires et neuronales. Récemment, des MSC humaines ont été découvertes dans le muscle squelettique adulte.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ne sont pas confinées dans la moelle osseuse mais elles sont également présentes dans différents organes tels que le placenta, la pulpe dentaire, les tendons, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le sang ombilical, et le liquide amniotique (Bi et al., 2007; Crisan et al., 2008; De Bari et al., 2001; Igura et al., 2004; Rogers and Casper, 2004; Shi and Gronthos, 2003; Tsai et al., 2004; Xu et al., 2005).

Elles peuvent être isolées assez facilement grâce à leur propriété d'adhésion au plastique. En effet, l'isolation des MSC à partir de la moelle osseuse ou d'autres tissus suivra les étapes suivantes : mise en culture de l'homogénat cellulaire directement, ou après une centrifugation pour une isolation à partir du tissu adipeux. Une fois la mise en culture faite, les cellules prolifèrent sur les boîtes de culture entre un et sept jours. Les cellules non adhérentes seront éliminées lors du changement de milieu. Dans le cas où des macrophages ou des cellules endothéliales seraient présentes, différents passages cellulaires sont utilisés pour les éliminer (Phinney et al., 1999). Ces techniques sont simples à réaliser et permettent d'obtenir une population homogène de cellules souches mésenchymateuses (Bourin et al., 2008).

Les cellules souches mésenchymateuses présentent de nombreux antigènes qui ne sont pas spécifiques et qui sont retrouvés à la surface de cellules différenciées. Une étude a montré que plusieurs marqueurs tels que STRO-1, HOP-26, CD49a et SB-10/CD166 permettent de différencier les MSC d'autres types cellulaires (Stewart et al., 2003). Par ailleurs, elles semblent échapper au système immunitaire. En effet, les MSC adultes expriment à de faibles niveaux les marqueurs du complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (**Figure 25**). Chez les MSC fœtales, leurs niveaux d'expression sont plus faibles que chez les MSC adultes (Deans and Moseley, 2000; Götherström et al., 2004; Le Blanc et al., 2003; Pittenger et al., 1999; Tse et al., 2003). Par ailleurs, les marqueurs du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) ne sont pas exprimés pas à leur surface (Le Blanc and Ringdén, 2005) constituant une caractéristique essentielle dans le but de les transplanter dans un hôte allogénique sans avoir besoin d'immunodéprimer le patient hôte.

De nombreuses études ont utilisé les cellules souches mésenchymateuses en thérapie génique et comme traitement dans la maladie du greffon *versus* l'hôte : GVHD (Graft-Versus-Host Disease). Elles possèdent des propriétés immunomodulatrices et sont capables d'inhiber la prolifération *in vitro* des lymphocytes T de manière dose dépendante

(Figure 25) (Di Nicola et al., 2002; Maitra et al., 2004). Ces cellules présentent une fonction paracrine (Peltzer et al., 2015) qui libèrerait des facteurs solubles tels que TGFβ1 et des interleukines dans le microenvironnement cellulaire (Di Nicola et al., 2002; Maitra et al., 2004; Prockop, 2007).



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 25: Propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses (Trivedi and Vanikar, 2013).

Les MSC possèdent à leur surface les marqueurs CD54, CD73, CD90, CD102, CD105 et le CMH de classe I. Elles inhibent la prolifération des lymphocytes T par la sécrétion d'INF-γ, interleukine (IL) 6, IL-8, de prostaglandine E2 et de facteurs de croissance SDF-1, VEGF et HGF. Ces cellules sécrètent également HLA-G qui va provoquer l'inactivation des cellules NK et des lymphocytes T et permettent aussi de favoriser la polarisation des Th en Th2 et en Tregs. Par ailleurs, les MSC vont inhiber la sécrétion de TNF et permettre celle d'IL-10 qui va bloquer la maturation des cellules dendritiques.

Les cellules souches mésenchymateuses possèdent une autre caractéristique majeure. En effet, elles sont capables de s'incorporer dans les sites de lésions et des sites tumoraux (Kidd et al., 2009). Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette intégration spécifique des MSC dans les tumeurs sont encore peu connus. Une hypothèse suggère que les MSC seraient attirées par le microenvironnement tumoral, qui est constitué d'un grand nombre de molécules pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) (Liu et al., 2009). En effet, des études *in vitro* ont démontré que la migration des MSC est régulée par différentes chimiokines, cytokines et leurs récepteurs dont SDF-1/CXCR4, SCF/cKit, HGF/c-Met,

VEGF/VEGFR, MCP-1/CCR et HMGB-1/RAGE (Aboody et al., 2008; Cihova et al., 2011; Karp and Leng Teo, 2009). La migration des MSC est aussi régulée par des molécules d'adhésion type intégrines et L-selectine, par les protéines de la matrice extracellulaire (MMP2, MT1-MMP) et par des cytokines (TNF, IFN...) (Augello et al., 2010; Birnbaum et al., 2007; Hemeda et al., 2010; Ringe et al., 2007).

Cette propriété de migration vers un tissu lésé existe à l'état physiologique et peut être mise à profit en thérapeutique pour avoir accès à des lésions ainsi qu'à des tumeurs difficiles d'accès (**Figure 26**).

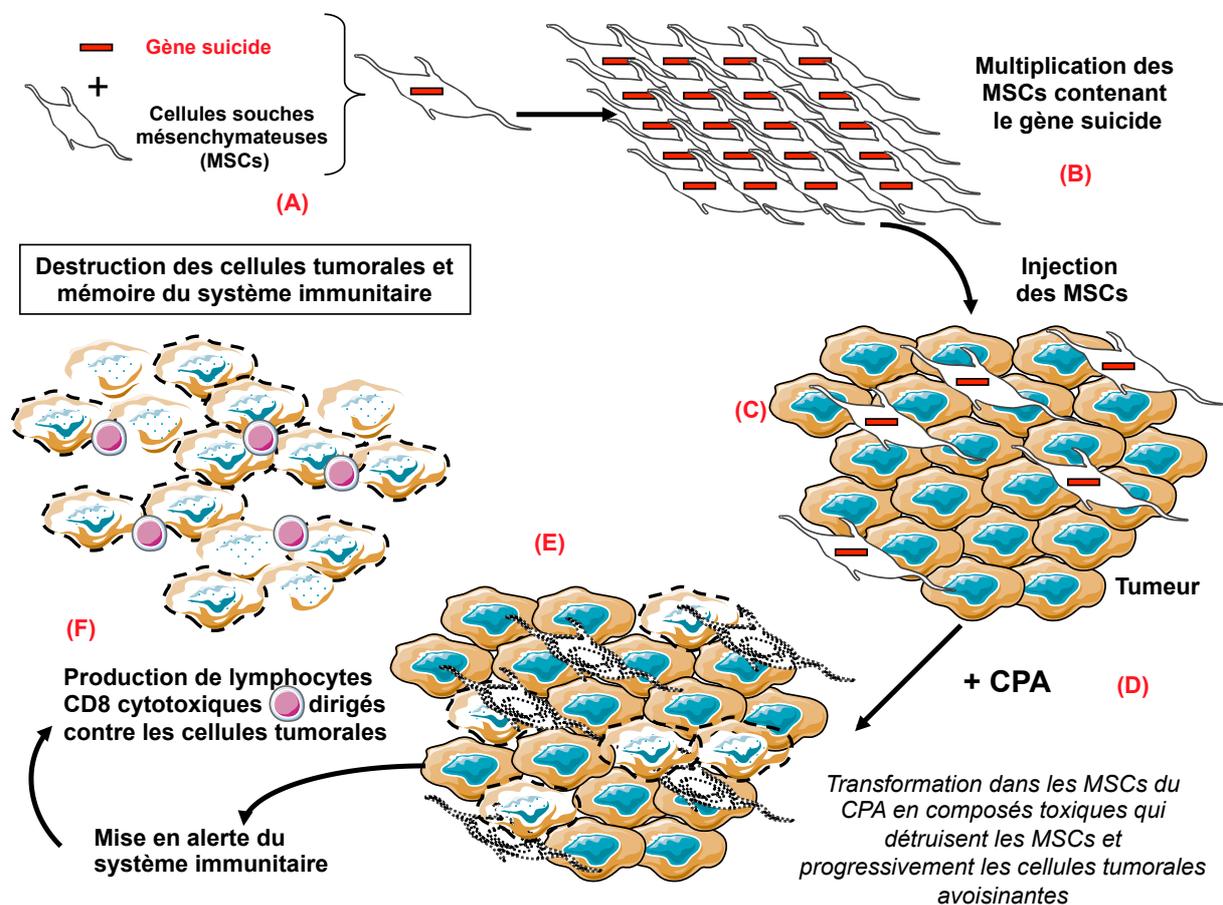


Figure 26 : Utilisation des cellules souches mésenchymateuses MSC comme vecteur de gène suicide.

(A) : Le gène suicide est introduit dans les MSC par transduction. (B) : les cellules transduites sont amplifiées en culture avant d'être injectées au modèle animal choisi. (C) : Une fois injectées, les MSC, grâce à leur tropisme vers l'environnement tumoral, se nichent à proximité des cellules tumorales. (D) et (E) : Après administration de la pro-drogue (cyclophosphamide), les MSC métabolisent la pro-drogue et subissent une mort cellulaire. (F) : les MSC mourantes relarguent le métabolite cytotoxique diffusant par effet "by-stander" vers les cellules tumorales entraînant leur mort. Ces dernières sont détruites et une mémoire immunitaire anti-tumorale peut être mise en place.

VI. Thérapie gène suicide utilisant les cellules souches mésenchymateuses (MSC) :

Parmi la multitude d'approches décrites précédemment et utilisées en pré-clinique pour la délivrance du gène suicide, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) comme vecteurs thérapeutiques a récemment émergé. En effet, depuis plus d'une dizaine d'années, les MSC sont utilisées pour le transfert de gènes dans différents modèles de cancers. Elles ont démontré, par de nombreuses études, leurs capacités à être transduites. Par conséquent, grâce à leurs propriétés de tropisme tumoral et à leur faible immunogénocité décrites dans le chapitre précédent, les cellules souches mésenchymateuses semblent être des vecteurs cellulaires très intéressants dans le cadre d'une thérapie par gène suicide.

Un grand nombre d'études ont testé l'utilisation des MSC comme vecteur avec différentes combinaisons enzymes / pro-drogue que j'ai précédemment décrites dans mon introduction tels que HSV-TK / Ganciclovir, la CD / 5-FC, CYP2B6 / Cyclophosphamide (nos propres travaux). Par ailleurs, d'autres études ont été menées avec les MSC couplées avec d'autres agents thérapeutiques tels que l'interféron γ , l'IL-12 et l'IL-2.

Dans le but d'avoir une idée globale de ce qui a déjà été réalisé concernant l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapie gène suicide, j'ai rédigé durant ma thèse une revue scientifique (ci-après) regroupant les principales études pré-cliniques utilisant les MSC et la stratégie de gènes suicides dans le traitement des tumeurs cancéreuses. Les effets secondaires potentiels de cette thérapie anti-tumorale basée sur l'utilisation de ces cellules souches ont également été examinés pour mettre en évidence les aspects qui doivent être améliorés avant l'utilisation clinique. Cette revue est intitulée *Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors* et a été publiée dans le journal *Biochimie* en 2014.

VII. Les Essais cliniques

1. La GDEPT en clinique

Le premier protocole de thérapie gène suicide s'adressait à des patients présentant des tumeurs cérébrales de types très variés qui regroupaient aussi bien les tumeurs gliales que les métastases. Les patients recevaient des injections stéréotaxiques de cellules d'encapsulation véhiculant HSV-TK, le tout sans intervention chirurgicale (Ram et al., 1997). Les résultats de cette étude ont été perçus comme plutôt négatifs, dans la mesure où l'efficacité du transfert de gène semblait très modeste et l'efficacité clinique difficile à évaluer (Martuza, 1997). Néanmoins, certains éléments d'efficacité ont été décrits comme la disparition de résidus tumoraux, observée par l'imagerie de résonance magnétique (IRM), suite au traitement par le ganciclovir. Par la suite, de nombreuses études ont eu lieu (**Tableau 8**), toutes utilisant le système HSV-TK/GCV cette fois-ci en utilisant comme vecteur les rétrovirus puis les adénovirus avec toujours comme cible principale le glioblastome (Eck et al., 1996; Klatzmann, 1996; Klatzmann et al., 1996; Sterman et al., 1998).

	Cibles	Vecteurs	Phase	Résultats	Références
Herpes simplex Virus Thymidine kinase / Ganciclovir	Cerveau	Rétrovirus	I	Sûreté du traitement	(Packer et al. 2000b)
			I/II	Efficace chez 20% des patients, fortes toxicités	(Prados et al. 2003b)
				Sûreté du traitement et efficacité démontrée	(Klatzmann, Valéry, et al. 1998b)
				Sûreté du traitement et efficacité démontrée	(Shand et al. 1999b)
		III	Pas de différence significative, bonne tolérance du traitement	(Rainov 2000b)	
		Adénovirus	I	Sûreté du traitement et efficacité démontrée	(Germano et al. 2003b)
			I	Sûreté du traitement et efficacité démontrée	(Trask et al. 2000b)
			III	Pas d'amélioration de la survie	(Westphal et al. 2013b)
		Vector producing cells (VPCs)	I	Faible niveau d'expression du gène dans les tumeurs	(Ram et al. 1997b)
	Plevre	Adénovirus	I	Tolérance du traitement, Bon niveau d'expression aux fortes doses	(Sterman et al. 1998b)
		Cellules	I	Tolérance du traitement	(Schwarzenberger et al. 2011b)
	Foie	Adénovirus	I	Tolérance du traitement	(Sangro et al. 2010b)
				Tolérance du traitement	(Sung et al. 2001b)
		Rétrovirus	I/II	Tolérance du traitement, faible réponse avec de faible niveau d'expression	(Klatzmann, Chérin, et al. 1998b)
	Prostate	Adénovirus	I	Tolérance du traitement	(Herman et al. 1999b)
			I/II	Tolérance du traitement avec de faibles toxicités	(Ayala et al. 2006b)
	ORL	Adénovirus	I	Tolérance du traitement	(Xu et al. 2009b)
	Cancers solides	Rétrovirus	I	Tolérance du traitement	(Singh et al. 2001b)

Tableau 8 : Résumé des principaux essais cliniques utilisant le système Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) / Ganciclovir

D'autres études cliniques ont été menées avec comme combinaison la cytosine désaminase et le 5-FC (**Tableau 9**). Une étude de phase I a eu lieu dans le début des années 2000 démontrant l'innocuité de l'administration en intra-tumorale de bactéries *Salmonella typhimurium* exprimant la cytosine désaminase sur des patients atteints de cancers métastatiques. Pour montrer cela, des patients ont reçu une injection de bactéries modifiées suivi d'un traitement *per os* avec le 5-FC, 4 jours après l'injection des bactéries (Cunningham

and Nemunaitis, 2001). Par la suite, la même équipe a lancé un autre essai dans le but de déterminer la dose maximale tolérable du vecteur associé au traitement 5-FC (Nemunaitis et al., 2003b). A l'heure actuelle, aucun résultat n'est encore disponible.

Peu d'essais cliniques portent sur l'utilisation de la nitroréductase et du CB1954 comme système enzyme/pro-drogue (**Tableau 9**). Une étude de phase I a été menée sur 18 patients atteints de tumeurs hépatiques (métastatiques ou primaires) ayant reçu une injection d'adénovirus recombinant exprimant la nitroréductase, sans traitement avec la pro-drogue, le CB1954. Le but de cette étude était de montrer l'innocuité du vecteur. Par ailleurs, une expression importante de la nitroréductase a été retrouvée dans les tumeurs (Palmer et al., 2004).

Une autre étude de phase I/II sur des patients atteints d'un cancer de la prostate a permis de mettre en évidence la bonne expression de l'enzyme au sein des tumeurs après injection intraprostatique de l'adénovirus exprimant la nitroréductase. Une amélioration des marqueurs biologiques a été observée chez les patients ayant reçu l'adénovirus et le traitement par le CB1954. Dans certains cas, une diminution de la taille des tumeurs a pu être observée. Enfin, une tolérance au traitement a été mise en évidence, malgré l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre les adénovirus (Patel et al., 2009).

Concernant le couple Désoxycytidine kinase (DCK) / Gemcitabine, une seule étude clinique a été réalisée à l'heure actuelle (**Tableau 9**). Il s'agit d'un essai de phase I sur des patients atteints de cancer du pancréas. Dans cette étude, la DCK est couplée à une autre enzyme, l'uridine monophosphate kinase (UMK). Après la validation de l'efficacité de la combinaison des deux gènes par des essais pré-cliniques, le gène de fusion DCK :: UMK a été administré sous forme plasmidique directement dans la tumeur, sous endoscopie et les patients ont été traités par la gemcitabine juste après l'injection pendant 2 mois. Les résultats obtenus ont permis de montrer la faisabilité de la technique ainsi que des effets 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 (Buscail et al., 2015b). Une étude de phase II est actuellement en cours de préparation afin de confirmer les résultats thérapeutiques obtenus.

	Phase	Cibles	Vecteur	Résultats	Références
Cytosine désaminase / 5-FC	I	Cancers métastatiques	Bactéries	Non toxique et expression du gène suicide dans les tumeurs	(Cunningham and Nemunaitis, 2001)
Nitroréductase / CB1954	I	Métastases hépatique du côlon et hépato carcinome cellulaire	Adénovirus	Tolérance du traitement et expression du gène suicide dans les tumeurs	(Palmer et al., 2004)
	I/II	Cancer de la prostate	Adénovirus	Tolérance du traitement, peu de toxicité	(Patel et al., 2009)
Désoxycytosine kinase / Gemcitabine	I	Cancer du pancréas	Plasmide	Tolérance du traitement et expression du gène suicide dans les tumeurs	(Buscail et al., 2015b)

Tableau 9 : Les principaux essais cliniques utilisant soit la Cytosine désaminase/5-FC, soit la Nitroréductase / CB1954 ou bien la Désoxycytosine kinase / Gemcitabine.

2. La thérapie génique utilisant les MSC en clinique

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) comme vecteur pour la thérapie génique est en pleine émergence. De nombreuses études pré-cliniques ont été développées mettant en exergue l'efficacité et l'intérêt thérapeutique de cette stratégie (voir chapitre V). Cependant, les essais cliniques sur le traitement des cancers par les MSC sont encore peu nombreux.

Les cellules souches mésenchymateuses sont souvent utilisées en clinique pour traiter la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) chronique ou aiguë (Kuzmina et al., 2012), certaines maladies auto-immunes tels que la sclérose en plaques (Karussis et al., 2010), la maladie de Crohn (Garcia-Olmo et al., 2009), le lupus érythémateux (Sun et al., 2010) ainsi que dans les maladies cardiovasculaires (Chen et al., 2004). Des essais cliniques ont aussi été menés en médecine régénérative (Horwitz et al., 2002; Wakitani et al., 2002). De plus, les MSC ont été utilisées en co-transplantation avec les cellules souches hématopoïétiques (Lazarus et al., 2005).

L'absence de mécanisme de sécurité après l'administration des MSC a pendant longtemps retardé l'application des cellules génétiquement modifiées en clinique (Kim and Cho, 2013). Toutefois, quelques essais cliniques ont pu voir le jour récemment (Tableau 10). En effet, une étude chez l'Homme est actuellement mise en place chez des patients atteints

de cancers gastro-intestinaux à un stade avancé. Ceux-ci vont recevoir des MSC recombinantes exprimant le gène de la thymidine kinase (HSV-TK) et être traités par la suite par le Ganciclovir (Niess et al., 2015). Cette étude est pour l'instant en cours de recrutement. Par ailleurs, une autre étude utilise des cellules souches mésenchymateuses transduites par un virus oncolytique pour traiter des cancers ovariens (Mader et al., 2013). Tous les essais cliniques listés dans le **Tableau 10** sont en cours de recrutement cependant aucun résultat n'est encore disponible.

Gène inséré dans les MSC	Cancer	Phase	Résultats	Clinical Trial n°
Interféron β (INF- β)	Ovaire	I	Pas encore disponible	NTC02530047
Rien	Prostate	I	Pas encore disponible	NTC01983709
Virus oncolytiques (MV-VIS)	Ovaire	I/II	Pas encore disponible	NTC02068794
HSV-TK	Gastro-intestinale avancée	I/II	Pas encore disponible	NTC02008539

Tableau 10 : Les principaux essais cliniques utilisant la thérapie génique à base de MSC

VIII. Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la thérapie par gène suicide présente pour le moment peu de résultats concluants chez l'Homme, malgré des essais très prometteurs obtenus ces dernières années lors des études pré-cliniques. En effet, pour obtenir une thérapie gène suicide efficace, *in vitro et in vivo* ainsi qu'en clinique, quatre points clés doivent être réunis :

- Avoir un **gène suicide très actif** qui métabolise efficacement une pro-drogue conduisant à la formation de métabolite(s) toxique(s).
- Posséder un **effet "by-stander" important**. Il s'agit du point sur lequel se base toute la stratégie gène suicide.
- Déclencher une **réponse immunitaire** cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales (= effet "by-stander" distant). Cette réponse est indispensable pour avoir une efficacité à long terme évitant toute récurrence et tout développement de métastases.
- Avoir une **méthode efficace de transfert** du gène suicide dans les tumeurs.

Par conséquent, mon travail de thèse s'est focalisé principalement sur l'optimisation du transfert de gène au sein des cellules tumorales. Il s'inscrit dans la suite d'un projet débuté il y a une quinzaine d'années, qui repose sur l'utilisation d'un triple mutant du cytochrome P450 2B6 (CYP2B6TM-RED) combiné à une pro-drogue, déjà connue et utilisée en clinique : le cyclophosphamide (Nguyen et al., 2008; Touati et al., 2014a; Tychopoulos et al., 2005). Les précédentes études réalisées ont permis de valider les trois premiers points clés de la thérapie par gène suicide (Touati et al., 2014a).

Dans ce contexte, le but de mon travail de thèse fut de valider les points suivants :

- Optimiser le transfert de notre gène suicide par l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses :

- Isolation d'un clone cellulaire avec de forts niveaux d'expression du gène suicide présentant une forte sensibilité à la pro-drogue
- Mise en évidence de l'effet "by-stander" *in vitro* sur différentes lignées tumorales murines et humaines
- Validation *in vivo* sur des souris immunocompétentes par injection intratumorale des cellules MSC exprimant le gène suicide
- Conservation de la réponse immunitaire observée dans les études précédentes

→ Ces résultats sont présentés dans l'**Article 1 récemment publié**

- Validation de notre stratégie *in vivo* sur un modèle de lapin avec une tumeur hépatique par injection intra-artérielle des MSC exprimant le gène suicide et traité au CPA

→ Ces résultats obtenus sont présentés dans l'**Article 2 soumis**

➤ Démontrer qu'une mort immunogénique est bien déclenchée par notre stratégie et qu'elle serait à l'origine de la réponse immunitaire observée dans les études *in vivo* précédentes :

- Identification des différents mécanismes qui définissent la mort immunogénique *in vitro*
- Etude de l'implication du système immunitaire dans le traitement *in vivo*

→ Ces résultats obtenus sont présentés dans l'**Article 3 en préparation**

RESULTATS ET DISCUSSION

Article 1



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel



Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors☆



Amara Ikrame^a, Pramil Elodie^a, Senamaud-Beaufort Catherine^a, Devillers Audrey^a, Macedo Rodney^b, Lescaille Géraldine^b, Seguin Johanne^c, Tartour Eric^d, Lemoine François^b, Beaune Philippe^a, de Waziers Isabelle^{a,*}

^a INSERM UMR-S1147, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France

^b Sorbonne University, UPMC/Paris 06, UMR-S INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Centre d'Immunologie et Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France

^c 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

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

Accepté dans J. Controlled release (Amara et al., 2016)

Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors

Amara Ikrame¹, Pramil Elodie¹, Senamaud-Beaufort Catherine¹, Devillers, Audrey¹, Macedo Rodney ², Lescaille Géraldine ², Seguin Johanne³, Tartour Eric⁴, Lemoine, François², Beaune Philippe¹ and de Waziers Isabelle¹.

Introduction :

Nous avons développé une approche gène suicide en utilisant comme combinaison enzyme / pro-drogue le cytochrome P450 2B6 et le cyclophosphamide. L'activité de ce cytochrome a été optimisée par trois mutations afin d'obtenir une plus grande efficacité pour métaboliser le CPA (Nguyen et al. 2008; Touati et al. 2014a). Un gène de fusion (CYP2B6TM-RED) a ensuite été construit, réunissant un triple mutant du CYP2B6 (CYP2B6TM) couplé à la réductase humaine (RED). Ce gène a une activité 13 fois plus élevée que le CYP2B6wt. Son efficacité a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo* (Touati et al., 2014a).

Bien que nous ayons obtenu un gène optimisé avec un effet "by-stander" important et une réponse immunitaire contre les cellules tumorales, un dernier point restait à améliorer : **la méthode de transfert de gène**. Depuis quelques années, un nouveau vecteur a vu le jour : les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules présentent un tropisme pour les tumeurs qui est induit par la présence de molécules pro-inflammatoires dans le microenvironnement tumoral (Spaeth et al., 2008).

Dans cet article, des MSC murines ont été transduites avec un lentivirus recombinant contenant le gène CYP2B6TM-RED. L'efficacité des MSC-CYP2B6TM-RED à métaboliser le CPA et l'effet "by-stander" ont été étudiés *in vitro* sur des cellules tumorales et *in vivo* sur des souris immunocompétentes C57Bl/6. De plus, des expériences de re-challenge ont été réalisées pour déterminer si notre stratégie MSC + gène suicide **déclenchait une réponse immunitaire** contre les cellules tumorales *in vivo*.

Principaux résultats :

L'amélioration de l'enzyme métabolisant la pro-drogue a souvent été réalisée dans la thérapie gène suicide (Ardiani et al., 2010; Black et al., 2001; Deng et al., 2011; Fuchita et al., 2009; Kaliberova et al., 2008; Preuss et al., 2011; Richard et al., 2007; Vernejoul et al., 2006). En effet, dans la plupart des systèmes enzyme-pro-drogue, des doses élevées de cette dernière doivent être administrées pour observer des effets sur les tumeurs. Ces fortes doses sont souvent accompagnées d'effets secondaires néfastes qui limitent son application chez l'Homme (Giraud et al., 2010; Karjoo et al., 2016).

Etant donné que nous avons augmenté l'efficacité de l'enzyme pour le CPA, nous avons étudié dans notre système CYP2B6TM-RED + CPA l'effet de doses plus faibles que celle utilisée dans les études précédentes sur modèle animal, (**Article 1, Figure 1**). Au bout de 4 injections de CPA, nous avons observé un effet dose dépendant sur la croissance tumorale chez le groupe de souris contrôles (TC1-Luc2) dans lesquels la métabolisation du CPA se fait dans le foie par l'isoforme orthologue du CYP2B6, le *cyp2b10* chez la souris. La dose de CPA de 90 mg/kg permet une efficacité similaire à la dose de 140 mg/kg sur les tumeurs exprimant le gène suicide tout en limitant la production hépatique de métabolites toxiques à l'origine des effets secondaires connus du CPA dont la toxicité vésicale de l'acroléine, ou bien la métabolisation par le CYP3A4 qui conduit à la formation d'un métabolite neurotoxique.

En outre, nous avons démontré que cette **réponse était dépendante des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques** (**Article 1, Figure 1 et Supplemental data Figure 1**).

Nous avons également isolé un clone cellulaire **MSC-CYP2B6TM-RED** particulièrement **efficace *in vitro* sur la lignée murine pulmonaire TC1**, mais aussi sur d'autres **lignées humaines** (ORL, seins, colons). Ainsi, nous avons démontré que l'utilisation des **MSC en tant que vecteur est beaucoup plus efficace que l'utilisation directe des lentivirus, *in vitro* et *in vivo***.

Grâce aux modèles de souris immunocompétentes, nous avons pu montrer que les MSC, une fois injectées en intra-tumoral, restaient nichées dans les tumeurs. De plus, **4 injections de MSC suivi du traitement par le CPA ont permis d'éradiquer complètement la tumeur chez un tiers des souris traitées**, sans aucune récurrence, six mois après leur guérison.

Pour finir, nous avons **observé une réponse immunitaire** similaire à celle vue dans les études précédentes (Touati et al., 2014a) grâce à des expériences de re-challenge.

Conclusions:

Dans cet article, nous avons démontré que les cellules souches mésenchymateuses sont de bons vecteurs pour notre gène suicide optimisé. Nous avons mis en évidence qu'elles métabolisent efficacement le CPA, que les métabolites qu'elles produisent diffusent et détruisent les cellules tumorales avoisinantes et que malgré les propriétés immunosuppressives connues des MSC, les expériences de re-challenge ont montré une éradication spontanée des tumeurs qui traduit le développement d'une réponse immunitaire spécifique aux cellules tumorales.

De plus, nous avons mis en évidence que cette stratégie était efficace sur différents types de tumeurs *in vitro*. Néanmoins, nous n'avons obtenu une réponse au traitement que chez 33% des souris. Ceci peut s'expliquer par la grande hétérogénéité du nombre de cellules réellement injectées par voie intra-tumorale. Nous devons ainsi améliorer la stratégie dans le but d'avoir 100% des souris présentant une éradication complète de la tumeur. Une des possibilités serait de changer de voie d'administration des cellules souches transduites.

Article 2

Proof of concept of a gene directed enzyme prodrug therapy with an intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rabbit Vx2 tumor hepatic model.

Pellerin O^{1*} ; Amara I^{2*} ; Sapoval M¹; Méachi T³; Déan C¹; Beaune Ph²; de Waziers I²

¹ Cardio-Vascular Radiology department : Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France

² INSERM UMR-S1147, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 45 rue des Saints Pères, 75006 Paris, France.

³ Pathology department : Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc 75015 Paris, France

*** Co-first authors**

Soumis à Radiology

Proof of concept of a gene directed enzyme prodrug therapy with an intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rabbit Vx2 tumor hepatic model.

Olivier Pellerin¹; **Ikrane Amara**²; Marc Sapoval¹; Tchao Méachi³; Carole Déan¹; Philippe Beaune²; Isabelle de Waziers²

Introduction :

Les résultats intéressants obtenus dans l'**Article 1** nous ont amenés à choisir une autre voie d'administration des cellules souches mésenchymateuses (MSC) dans le but d'améliorer l'efficacité de ta stratégie.

Nous avons donc décidé de les injecter par **voie intra-artérielle**. Cette technique permet d'administrer des agents thérapeutiques, dont les MSC, au plus près de la tumeur tout en limitant un éventuel passage dans la circulation générale qui pourrait conduire à une toxicité systémique. Cette voie d'administration est de plus en plus utilisée dans le traitement de certaines tumeurs (hépatiques, gastro-intestinales...) par des radiologistes interventionnels (Liapi and Geschwind, 2007).

Dans cet article, nous avons, par conséquent, changé de modèle animal pour le lapin White New Zealand afin de pouvoir réaliser ces injections intra-artérielles. Nous avons également modifié la cible tumorale : nous avons travaillé cette fois-ci sur une lignée tumorale hépatique de lapin Vx2, qui permet de mettre en place un modèle classique d'hépatocarcinome (Lee et al., 2009). L'hépatocarcinome pourrait constituer notre première cible en clinique car, depuis 20 ans, aucun gain réel de survie n'a été observé chez ces patients (moins de 20% de survie à 5 ans ; <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/livibd.html> Bruix, Reig, and Sherman 2016).

Préalablement, nous avons vérifié *in vitro* que ces cellules Vx2 n'étaient pas sensibles au

cyclophosphamide (CPA) avant sa métabolisation en molécules toxiques. L'efficacité de notre stratégie a, par ailleurs, été testée :

- **In vitro** : grâce à des co-cultures de cellules Vx2 et de cellules souches mésenchymateuses exprimant notre gène suicide puis traitées au CPA.

- **In vivo** : sur des tumeurs hépatiques ortho-topiques chez le lapin après injection de cellules Vx2. Pour cela, nous leur avons administré par voie intra-artérielle des MSC exprimant le transgène CYP2B6TM-RED suivi d'une injection de CPA en intraveineuse.

Cette étude constitue **une première expérience sur ce modèle animal** pour faire la preuve de concept de notre stratégie par gène suicide utilisant comme vecteurs les cellules souches mésenchymateuses administrées par la voie intra-artérielle.

Principaux résultats :

Après une injection intra-artérielle, les **MSC** exprimant la luciférase (MSC-Luc2) **sont localisées uniquement dans la tumeur hépatique**. Aucun échappement vers d'autres organes n'a été détecté. Cette expérience préliminaire démontre la spécificité des MSC à se nicher dans le microenvironnement tumoral.

Par la suite, une diminution significative de la croissance tumorale a été observée chez les **lapins traités** par notre stratégie en comparaison aux lapins des groupes contrôles (non traités ou traités au CPA seul). Ce résultat est confirmé par **les analyses d'histopathologies** sur les tumeurs récupérées à J25, jour du sacrifice des animaux. Ces analyses **ont montré que dans le cas des tumeurs traitées** par les MSC-CYP2B6TM-RED suivis du traitement par le CPA, **des plages nécrotiques de près de 80% de la taille de la tumeur** ont été retrouvées. En comparaison, les tumeurs traitées par le CPA seul et les tumeurs contrôles présentent respectivement 40% et 5% de nécrose.

Un autre point essentiel ressort de cette expérience: **la diminution voire même l'absence de nodules pariétaux ainsi que de métastases pulmonaires chez 2 des 3 lapins ayant reçu deux injections de MSC-CYP2B6TM-RED + CPA alors que ce modèle tumoral Vx2 est pourtant connu pour être très agressif et pour induire le développement très rapide de métastases pulmonaires** (Tabuchi et al., 1991).

Conclusion :

Nous avons démontré que l'injection intra-artérielle des MSC-CYP2B6TM-RED suivie d'un traitement au CPA entraînait une diminution de la croissance tumorale après un cycle de traitement avec une importante nécrose tumorale. Le renouvellement du traitement a, quant à lui, eu pour résultat de diminuer le nombre de métastases (au niveau pariétal et pulmonaire).

D'autres pistes s'offrent à nous pour atteindre une éradication complète de la tumeur ainsi que pour développer une réponse immunitaire contre l'apparition de nodules et de métastases, comme ce qui a été observé dans le modèle souris précédemment présenté (**Article 1**) (Amara et al., 2016). Ces pistes seront développées dans la partie perspective de la thèse (*cf. PERSPECTIVES*).

**Importance relative de la réponse cytotoxique et
de la réponse immunitaire dans l'efficacité du
traitement par les cellules souches
mésenchymateuses exprimant le CYP2B6TM-RED
et par le CPA**

Introduction :

Lors des précédentes études *in vivo* réalisées sur des souris (Amara et al., 2016; Touati et al., 2014a), nous avons observé le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. Nous avons démontré que cette réponse est dépendante des lymphocytes T CD8⁺ (Amara et al., 2016).

Par conséquent, nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle la réponse immunitaire contre les cellules tumorales est associée à une mort immunogénique des cellules tumorales.

Précédemment, des études ont montré que le CPA faisait partie des agents inducteurs des DAMPS (Damaged Associated Molecular Patterns) qui sont des signaux caractéristiques de cette mort cellulaire (Garg et al., 2015). Dans des conditions physiologiques, ces signaux ne sont pas accessibles aux cellules du système immunitaire, telles que les cellules dendritiques. Par conséquent, le but de notre travail a été de vérifier si notre stratégie, combinant les MSC-CYP2B6TM-RED et le CPA, déclenchait une mort immunogénique des cellules tumorales.

Pour cela, nous avons étudié *in vitro* les différents marqueurs clés de cette mort cellulaire qui sont :

- La translocation de la calréticuline et de la protéine ERp57 au niveau de la membrane cellulaire
- L'induction de l'autophagie par la présence de LC3II
- Le relargage d'HMGB-1 dans le milieu extracellulaire
- La libération d'ATP

De plus, nous avons évalué, *in vivo*, l'importance relative de la cytotoxicité directe et de la réponse immunitaire dans l'éradication de la tumeur initiale. Dans ce but, nous avons comparé l'efficacité du CPA sur des souris C57Bl/6 **immuno-compétentes xénogreffées avec des cellules tumorales exprimant le gène suicide (TC1-CYP2B6TM-RED) et déplétées ou non en lymphocytes T CD8⁺**.

Matériels et méthodes :

1. Cultures cellulaires

Les cellules souches mésenchymateuses murines (MSC) de souris C57BL/6 provenant de chez GIBCO sont cultivées dans du milieu DMEM High glucose (4,5 g/L glucose ; avec de la L-glutamine ; sans sodium pyruvate et sans HEPES) (Life technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SFV) (Dutcher), de la pénicilline (200 UI/mL) (Life technologies), de la streptomycine (50 µg/mL) (Life technologies) de la fungizone (0,5 µg/mL) (Life technologies) et 1% de sodium pyruvate (1nM) (Life technologies).

Les cellules TC1 (lignée tumorale pulmonaire de souris C57BL/6) sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (L-glutamine) (Life technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, de la pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 µg/ml) et 1% de sodium pyruvate (1nM).

Lorsque les cellules (MSC murines et TC1) sont à confluence, elles sont rincées une fois au PBS 1X (Life technologies) puis dissociées à l'aide de la trypsine/EDTA 0,05% (Life technologies) qui agit pendant 5 minutes à 37 °C. Puis, la trypsine est inactivée en ajoutant du milieu de culture et les cellules sont diluées dans une nouvelle flasque et incubées dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂.

Le milieu de culture des cellules est renouvelé tous les deux jours.

2. Traitement des cellules tumorales TC1

Jour 1:

Les MSC exprimant le gène suicide (MSC-CYP2B6TM-RED) (Amara et al., 2016) et les MSC non transduites (MSC NI) sontensemencées à 250.000 cellules par puits dans une plaque de 6 puits. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

Jour 2:

Les MSC sont traitées avec 0,25 mM de cyclophosphamide pendant 24 heures. Les cellules tumorales TC1 sontensemencées à 250.000 cellules par puits dans une plaque de 6 puits.

Jour 3:

Après 24 heures de traitement au CPA, le surnageant des MSC exprimant le gène suicide ou non est récupéré et transféré sur les cellules tumorales TC1. Le contrôle négatif de l'expérience est le surnageant des cellules MSC non transduites (MSC-NI) traitées au CPA. Les TC1 sont ainsi incubées **1)** pendant 24 heures et récupérées pour l'étude de la translocation de la calréticuline et l'induction de l'autophagie ou **2)** pendant 48 heures jusqu'à la mort de la majorité des cellules, le surnageant est ensuite récupéré pour l'étude du relargage de la protéine HMGB-1 (**Figure 27**).

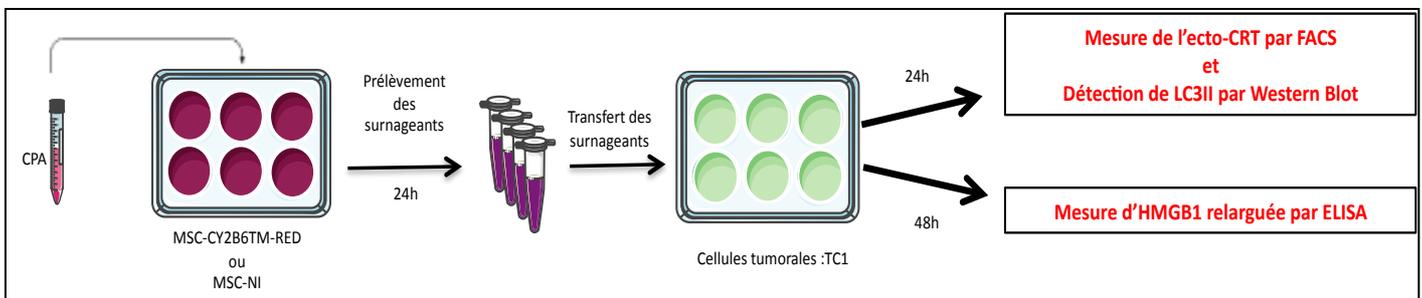


Figure 27: Protocole explicatif du traitement des TC1.

Les cellules souches mésenchymateuses, exprimant le gène suicide (MSC-CYP2B6TM-RED) ou non (MSC-NI), sont traitées par le cyclophosphamide (CPA) et incubées pendant 24h. Le surnageant de ces cellules est alors récupéré et transféré sur les cellules tumorales TC1. Celles-ci vont rester en contact avec le surnageant le temps désiré (24 ou 48h) selon l'analyse à faire par la suite.

3. Etude de cytotoxicité par le test MTS

Des études MTS ont été réalisées afin de déterminer les bonnes conditions de traitement : dose de CPA et durée du traitement, permettant de n'avoir que 20% de mortalité des cellules tumorales afin d'observer les mécanismes de la mort immunogénique. Ces tests ont été réalisés précédemment dans l'**Article 1** (Amara et al., 2016), ce qui nous a permis de déterminer la dose de 0,25 mM de CPA avec un traitement de 24 heures.

4. RT-PCR

- Extraction des ARN totaux

À partir de 500 000 cellules, les ARNs sont extraits des cellules à l'aide du Kit RNase mini Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. Les ARNs sont quantifiés par la lecture au spectrophotomètre (Nanodrop).

- Transcription inverse (RT)

Les ARNs sont rétrotranscrits en ADN complémentaires à l'aide du kit «High Capacity cDNA Reverse Transcription kit» (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, la réaction se fait dans un volume final de 22 µl: 2µl de tampon RT, 0,8µl de dNTP 100mM, 2µl d'amorces de séquences aléatoires, 1µl de transcriptase inverse (MultiScribe RT 50U/µl), 4,2µl d'eau RNase Free et finalement 500 ng d'ARN dilués dans un volume final de 12µl d'eau RNase Free. Les tubes sont ensuite placés 2 heures à 37°C.

- PCR quantitative

Les ADNc cibles sont amplifiés par PCR quantitative en temps réel. Dans une plaque de 384 puits, chaque échantillon est testé en triplicate avec des amorces spécifiques pour le gène cible (LC3) et le gène de référence (TBP: TATA-Binding Protein) (**Tableau 11**).

TBP	Amorce sens : 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'
	Amorce antisens : 5'-CACTCACAGCTCCCCACCA-3'
LC3	Amorce sens : 5'-CATGCCGTCCGAGAAGACCT-3'
	Amorce antisens : 5'- GATGAGCCGGACATCTTCCACT-3'

Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR

5. Western blot

- Extraction des protéines

Après traitement, les cellules tumorales TC1 sont trypsinées puis centrifugées 5 minutes à 800 g. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot cellulaire est lavé avec du PBS et centrifugé une nouvelle fois pour éliminer le PBS. Le culot cellulaire est remis en

suspension dans le tampon RIPA (89901, Thermo scientific) (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1 % (v/v), Triton X-100 1 % (v/v), déoxycholate de sodium 1 % (p/v), SDS 0,1 % (p/v), iodoacétamine 5 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4) contenant 15% d'inhibiteur de protéase (11836145001, Roche). Les cellules sont incubées pendant 10 min à 4°C. Après centrifugation à 12 500 g à 4°C pendant 10 min, le surnageant est prélevé et sa concentration en protéines est déterminée à l'aide du kit BCA (23225, Pierce) en mesurant l'absorbance à 562 nm et en utilisant une gamme de BSA (sérum albumine bovine) comme gamme étalon.

- Séparation des protéines par électrophorèse dans un gel SDS-PAGE

Après la détermination de la concentration protéique de chaque échantillon, 20 µg de protéines sont mélangés avec 0,6 V (volume) d'une solution de reprise (1 ml de glycérol à 60% + 200 µl Tris 2M pH 6,8 + 600 µl de sodium dodécylsulfate (SDS) à 10% + 40 µl de pyronine + 160 µl d'eau) et incubés à 100°C pendant 2 minutes afin d'être dénaturés.

Les échantillons, ainsi qu'un marqueur de masses moléculaires (Precision Plus Protein Standards, 161-0374 Bio-Rad) sont déposés par la suite dans un gel SDS-PAGE 12% (sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse. La migration se fait grâce à un courant électrique d'intensité 40mA et de tension maximale 180 V dans le tampon de migration (161-0772, Bio-Rad).

- Transfert des protéines sur membrane et «immunoblotting»

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure PVDF (HYBOND™ P, GE Healthcare Europe) avec un courant d'intensité 3mA/cm² et une tension maximale de 25V. Le transfert a lieu pendant une heure en milieu semi-sec en présence du tampon de transfert (166-0771, Bio-Rad).

Les sites non spécifiques sur la membrane sont saturés par une solution de blocage (5% lait, TBS Tween (Tris HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, 0,05% Tween 20)) pendant une heure. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (anti-LC3 lapin 2775S, Cell Signaling) à 4°C toute la nuit.

La membrane est lavée trois fois avec du TBS-Tween et incubée une heure avec l'anticorps

secondaire couplé à l'enzyme HRP «horseradish peroxydase» correspondant (Anti-rabbit IgG HRP, 7074S, Cell Signaling).

L'activité peroxydase est mise en évidence par incubation de la membrane avec le substrat de chimioluminescence ECL du kit Clarity Western ECL substrate (170-5061, Bio-Rad) pendant une minute. La membrane est ensuite mise à exposer sur un film photographique (28-9068-39, GE healthcare). Ce dernier est développé et interprété.

6. ELISA

Le kit ELISA «Sandwich» spécifique de la protéine HMGB-1 est commercialisé par IBL international (ST51011). Le test a été réalisé selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons, le contrôle positif et les solutions étalons sont distribués sur les puits préalablement recouverts d'un anticorps spécifique à la protéine HMGB-1. Ils sont incubés pendant 24 heures à 37°C. A la fin de l'incubation, les puits sont lavés 5 fois avec «la solution de lavage» fournie avec le kit. «Le conjugué enzymatique» (anticorps couplé à l'enzyme HRP) est ajouté dans chaque puits et incubé pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont lavés à nouveau 5 fois avec «la solution de lavage». Enfin, «la solution de couleur» (substrat chromogène : 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)) est ajoutée au puits pour pouvoir réagir avec le conjugué HRP. Après une incubation de 30 minutes, la réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant «la solution Stop», la couleur vire du bleu au jaune et la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN) à 450 nm.

La concentration de la protéine HMGB-1, présente dans les échantillons, est déterminée grâce à la courbe étalon réalisée à partir des solutions étalons fournies.

7. Cytométrie en flux

5 x 10⁵ cellules TC1 sont récupérées après avoir été traitées avec le surnageant des MSC exprimant ou non le gène suicide traitées au CPA pendant 24h. Après avoir été lavées au PBS, les cellules vont être incubées dans la solution de blocage (PBS + 5% de NGS « Normal goat serum») pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont rincées au PBS et sont incubées soit avec l'anticorps de souris anti-Calréticuline (1 µg/10⁶ cellules) (Abcam), soit

avec l'anticorps de souris anti-ERp57 (2 $\mu\text{g}/10^6$ cellules) (Abcam) dans la solution de marquage (PBS + 2% NGS) pendant 20 minutes à température ambiante. Enfin, après un lavage au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris (H+L) Alexa Fluor 488 (1/200^{ème}) (Abcam), toujours dans la solution de marquage pendant 20 minutes à température ambiante.

Les cellules sont ensuite rincées au PBS et analysées avec le BD FACSCanto II (BD biosciences). Pour finir, les résultats sont traités avec le logiciel FlowJo.

8. Modèle animal

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris C57BL/6 femelles (Janvier, Saint-Berthevin, France) âgées de 11 semaines. Les expériences ont été conduites en accord avec les procédures éthiques, et avec l'approbation du comité d'éthique de l'Université Paris Descartes (CEEA34.IW.031.11).

8.1 Effet de la stratégie gène suicide sur des souris déplétées en CD8

5 x 10⁵ cellules TC1-Luc2 ou TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED ont été diluées dans 50 μL de PBS stérile et injectées en sous-cutané au niveau du flanc gauche des souris, comme décrit précédemment (Touati et al., 2014b). Lorsque la tumeur atteint les 500 mm³, les souris porteuses de tumeurs TC1-Luc2 ou TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED ont été divisées en quatre groupes qui sont les suivants : un groupe contrôle sans CPA, un groupe traité par le CPA (90 mg/Kg), un groupe traité préalablement par des anticorps anti-CD8 (100 μg /souris) (Burrack et al., 2015) puis traité au CPA (90mg/Kg) et enfin un groupe traité uniquement par les anticorps anti-CD8. Le CPA et les anticorps anti-CD8 sont dilués dans du PBS stérile et sont administrés une fois par semaine pendant quatre semaines pour le CPA et une fois par semaine jusqu'au sacrifice des souris pour les anticorps anti-CD8, afin de maintenir la déplétion des lymphocytes T CD8⁺. La croissance tumorale est évaluée par des mesures au pied à coulisse (Vernier) et le volume tumoral est calculé selon la formule suivante : volume (mm³) = (Longueur x largeur²)/2.

9. Statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type (SD) de n expériences et la comparaison entre les groupes est faite en utilisant des tests non paramétriques dont : le test de Kruskal-Wallis, le test de Mann-Whitney et le test t non apparié.

Résultats :

1. Translocation de la calréticuline à la surface des cellules :

La première étape de la mort immunogénique va être la translocation de la calréticuline du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique. Cette protéine étant naturellement présente dans la cellule au niveau cytoplasmique, nous avons décidé d'analyser cette translocation par Cytométrie en flux sans perméabiliser les cellules afin d'observer uniquement la calréticuline transloquée à la surface. Nous avons donc traité des cellules tumorales TC1 avec le surnageant des MSC-CYP2B6TM-RED traitées au CPA et nous avons pris comme contrôle négatif le surnageant des MSC NI traitées au CPA.

La simple présence du surnageant des MSC NI va induire une légère expression de la calréticuline à la surface des cellules tumorales (**Figure 28 A**). Toutefois, celle-ci est plus faible que l'expression observée après le traitement avec le surnageant des MSC-CYP2B6TM-RED + CPA (**Figure 28 A**).

Une différence significative est mis en évidence entre ces deux traitements, ce qui montre bien que le **CPA**, métabolisé par notre gène suicide présent dans les MSC, induit une augmentation de la **translocation de la calréticuline à la surface des cellules TC1 (Figure 28 B)**.

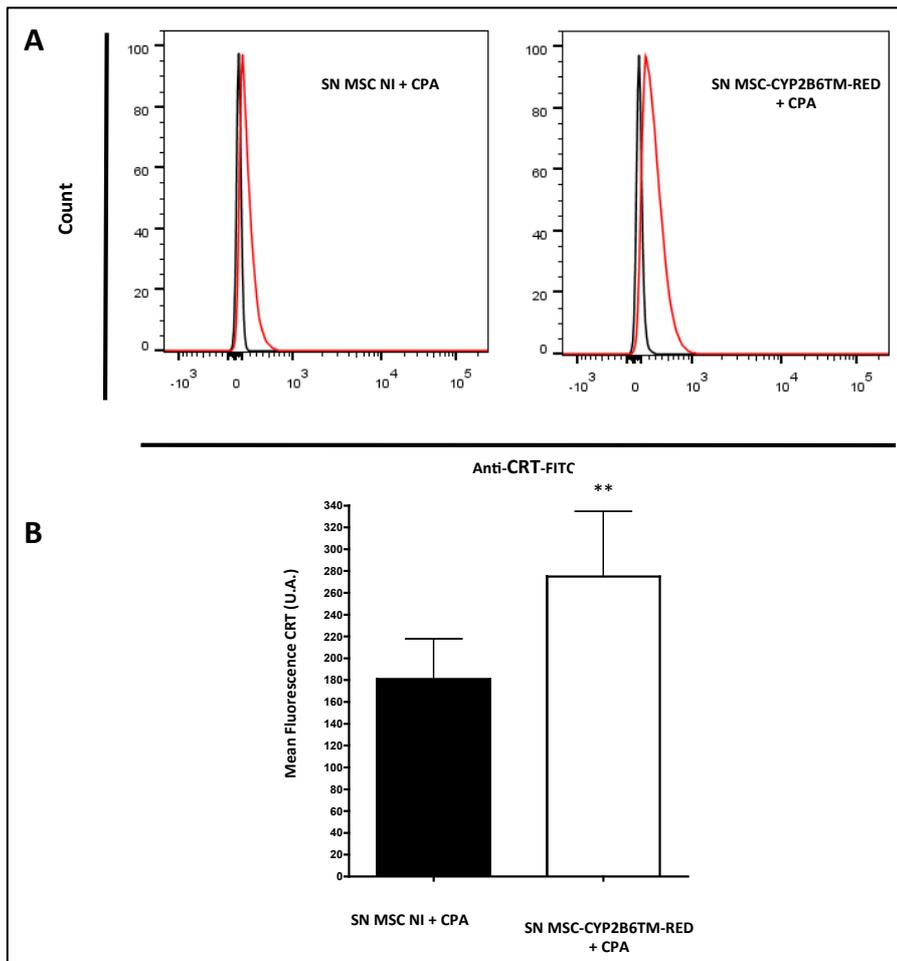


Figure 28 : Exposition de la Calréticuline (CRT) dans la mort immunogène.

Les cellules tumorales TC1 sont traitées soit par le surnageant des MSC NI +CPA (SN MSC NI + CPA), soit par celui des MSC-CYP2B6TM-RED + CPA (SN MSC-CYP2B6TM-RED + CPA). (A) Détermination de la CRT à la surface des cellules TC1 par Cytométrie en flux avec un anticorps anti-CRT sur cellules vivantes. (B) Fluorescence moyenne de l'anti-CRT-FITC +/- SEM issue de 5 expériences indépendantes. Test de Kruskal-Wallis ** $p < 0,01$ versus contrôle SN MSC NI + CPA.

Cette translocation peut être causée par un stress du réticulum endoplasmique induit par les métabolites du CPA. Pour vérifier ceci, nous avons regardé si la protéine ERp57, protéine du réticulum endoplasmique, était également transloquée à la surface des cellules tumorales. En effet, des études ont précédemment montré que la calréticuline était transloquée avec d'autres protéines du réticulum endoplasmique dont ERp57 à la surface des cellules après un stress du réticulum endoplasmique (Panaretakis et al., 2008, 2009). Par conséquent, nous avons étudié la translocation de cette protéine de la même manière que pour la calréticuline.

De façon intéressante, nous observons exactement le même résultat que celui obtenu lors de l'étude de la calréticuline, c'est-à-dire une expression basale de ERp57 en présence

du surnageant des MSC NI + CPA et une augmentation significative encore plus importante du signal en présence du surnageant des MSC-CYP2B6TM-RED + CPA (**Figure 29 A et B**).

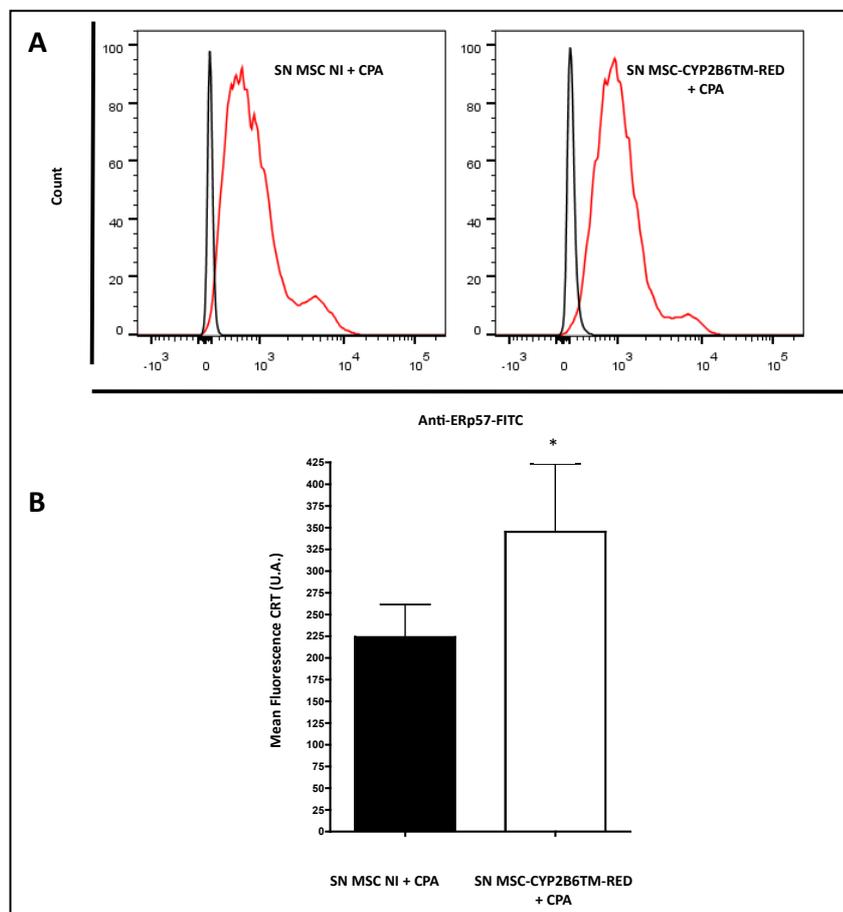


Figure 29 : Exposition de l'ERp57 dans la mort immunogène.

Les cellules tumorales TC1 sont traitées soit par le surnageant des MSC NI + CPA (*SN MSC NI + CPA*), soit par celui des MSC-CYP2B6TM-RED + CPA (*SN MSC-CYP2B6TM-RED + CPA*). (A) Détermination de l'ERp57 à la surface des cellules TC1 par Cytométrie en flux avec un anticorps anti-ERp57 sur cellules vivantes. (B) Fluorescence moyenne de l'anti-ERp57-FITC FITC +/- SEM issue de 5 expériences indépendantes. Test de Kruskal-Wallis : * $p < 0,05$ versus contrôle SN MSC NI + CPA.

2. Induction de l'autophagie par le CPA :

De nombreuses études ont montré que certains inducteurs de la mort immunogène induisaient une autophagie qui serait à l'origine des étapes suivant la translocation de la calréticuline dont le relargage d'HMGB-1 et la libération d'ATP (Garg et al., 2013b; Thorburn et al., 2009b). Ici, nous avons analysé l'effet d'un traitement des cellules tumorales avec notre stratégie gène suicide sur l'induction de l'autophagie.

Nous avons, dans un premier temps, déterminé la durée nécessaire pour induire

l'autophagie dans des cellules tumorales à la suite de leur exposition au surnageant des MSC exprimant le gène suicide et traitées au CPA grâce à l'étude de l'expression de LC3 par RT-qPCR.

Pour cela, les cellules tumorales ont été mises en contact, pendant 6, 16, 24 et 30 heures, avec le surnageant des MSC, exprimant ou non le gène suicide, ayant été traitées au CPA.

Après un traitement de 6 et 16 heures, nos résultats ne montrent pas une différence significative du niveau d'ARNm de LC3 entre les $2^{-\Delta\Delta Ct}$ des TC1 exposées au surnageant des MSC-CYP2B6TM-RED ou au surnageant des MSC-NI. Cependant, la quantité de transcrits de LC3 double dans les cellules exposées pendant 24 et 30 heures au surnageant des MSC-CYP2B6TM-RED (**Figure 30**).

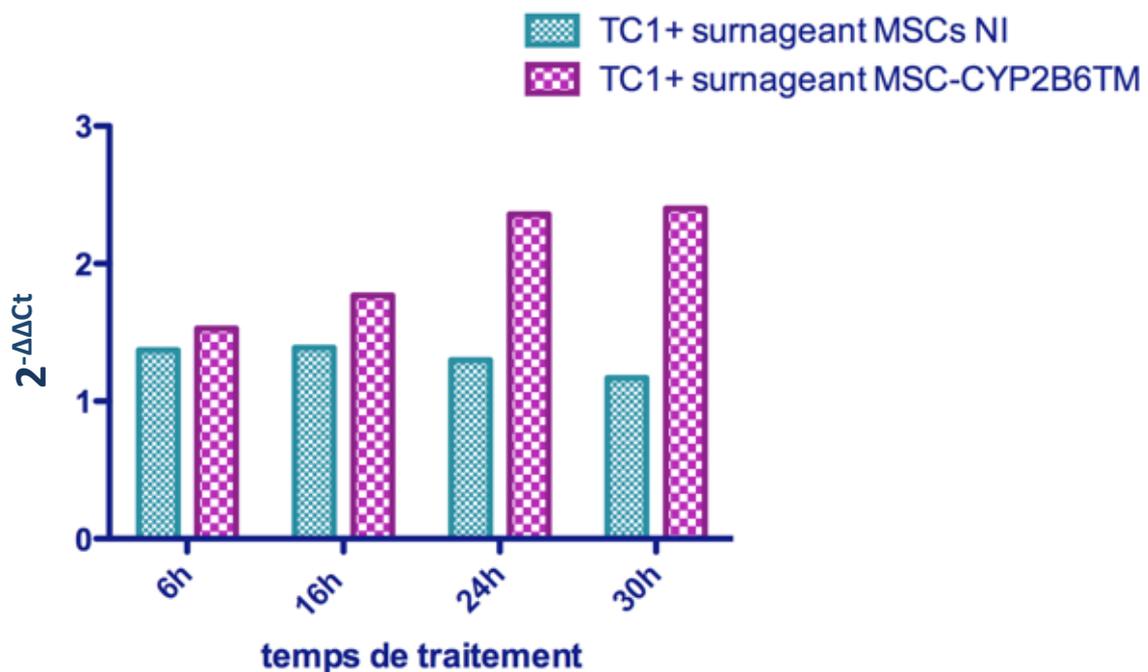


Figure 30 : Expression de l'ARNm de LC3 dans les cellules tumorales TC1 exposées au surnageant des MSC, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.

À partir du résultat de cette expérience préliminaire, nous avons décidé de choisir un traitement de 24 heures pour étudier le niveau d'expression de l'ARNm de LC3 par qRT-PCR et l'expression protéique de sa forme II par Western Blot. En effet, lors de l'induction de l'autophagie, la protéine LC3 subit une suite de modifications post-transcriptionnelles

aboutissant à sa liaison avec le phosphatidyléthanolamine lui permettant de s'incorporer dans la membrane du pré- autophagosome. Cette forme, **LC3-II**, est considérée comme un **marqueur moléculaire de l'autophagie** étant donné son implication dans la formation de l'autophagosome mature.

L'analyse par qRT-PCR des niveaux d'expression de l'ARNm LC3 montre que les cellules tumorales TC1 exposées au surnageant des MSC exprimant le gène suicide et traitées au CPA expriment deux fois plus d'ARNm LC3 que les cellules tumorales ayant reçu le surnageant des MSC contrôles ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1,32 Vs 2,88) (**Figure 31**).

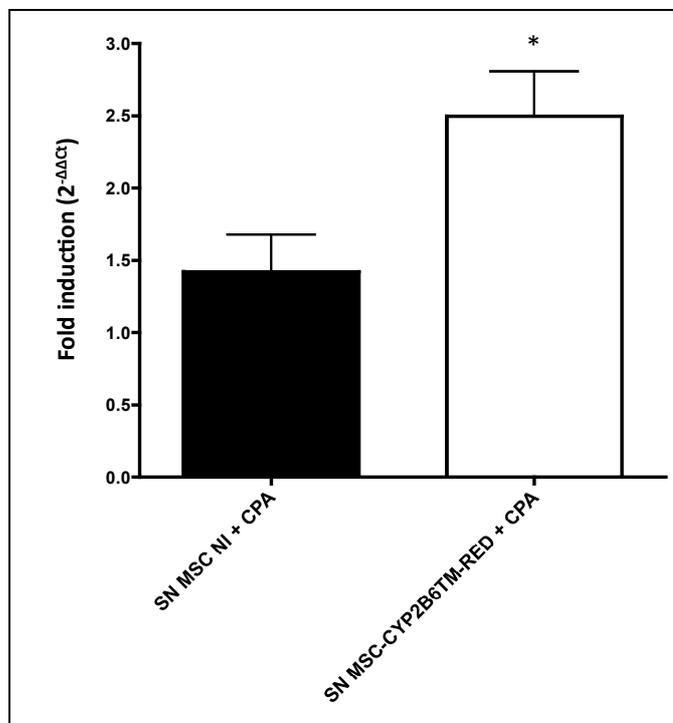


Figure 31: Expression de l'ARNm du LC3 dans les cellules tumorales TC1 exposées pendant 24 heures au surnageant des MSC, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA.

Les valeurs représentées sont la moyenne +/- SEM de trois expériences. Test de Mann-Whitney : * $p < 0,05$ versus contrôle SN MSC NI + CPA.

Les résultats du Western-Blot (**Figure 32**) montrent, quant à eux, une augmentation de la forme II de LC3 au niveau des cellules tumorales exposées au surnageant des MSC

contrôles. Cependant, cette augmentation est beaucoup plus importante dans les cellules exposées au surnageant des MSC exprimant le gène suicide.

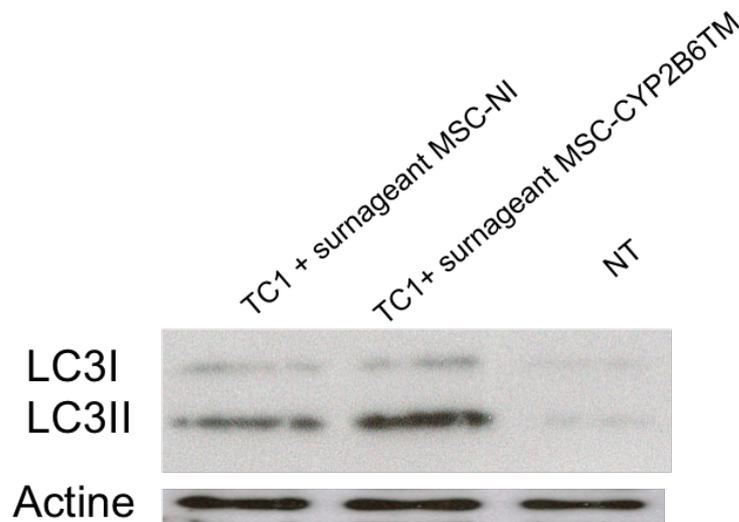


Figure 32: Expression de la forme II de la protéine LC3 dans les cellules tumorales TC1 exposées pendant 24 heures au surnageant des MSC, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA. NT correspond aux cellules TC1 non exposées au surnageant des MSC.

3. Relargage d'HMGB-1 dans le milieu extracellulaire :

Pour finir, nous avons évalué si notre stratégie gène suicide conduit bien au relargage d'HMGB-1, qui est présent dans le noyau à l'état physiologique.

Etant donné que cette étape a lieu plus tardivement dans le processus de la mort immunogénique, le traitement des cellules tumorales avec le surnageant des MSC, contenant ou non le gène suicide, et traitées au CPA lors de ces expériences a été prolongé jusqu'à 48 heures au lieu des 24 heures comme décrit précédemment.

Le surnageant des cellules tumorales a été ensuite récupéré et la concentration de la protéine HMGB-1 qu'il contient a été dosée par un test ELISA sandwich. Des cellules TC1 traitées avec 200 μ M d'oxaliplatine (un médicament capable d'induire la mort immunogénique) ont été utilisées comme contrôle positif de l'expérience.

Ces ELISA montrent que les cellules tumorales exposées au surnageant des MSC exprimant le gène suicide et traitées au CPA relarguent dans leur milieu de culture 3 fois plus de HMGB-1 en comparaison avec les cellules tumorales TC1 traitées avec le surnageant des MSC-NI traitées au CPA (29,2 μ g/ml Vs 86,6 environ μ g/ml) (**Figure 33**).

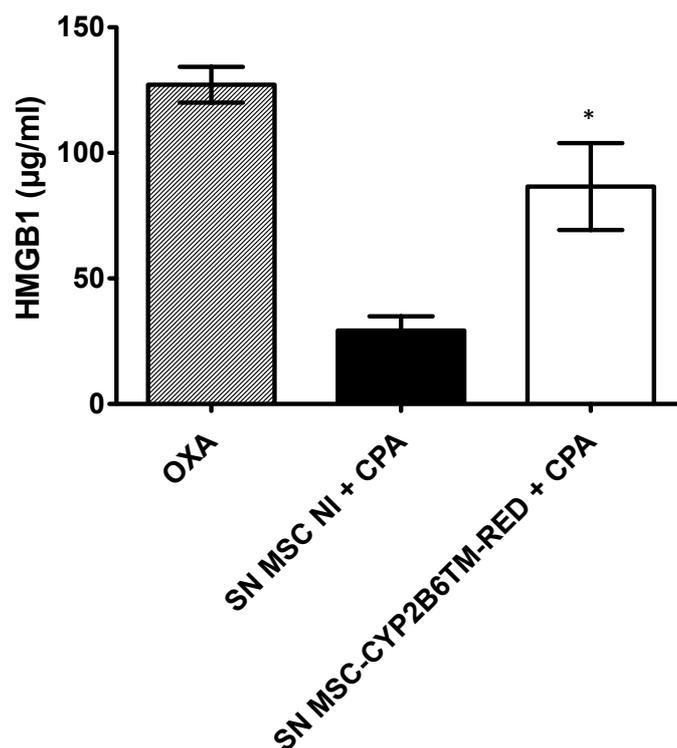


Figure 33 : Dosage de la protéine HMGB-1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dans le surnageant de culture des cellules tumorales TC1 exposées pendant 48 heures au surnageant des MSC, exprimant ou non le gène suicide, et traitées au CPA. Des cellules tumorales TC1 traitées par $200 \mu\text{M}$ d'oxaliplatine (OXA) sont utilisées comme contrôle positif de l'expérience. Les valeurs représentées sont la moyenne \pm SEM de trois expériences. Test de Mann-Whitney : * $p < 0,05$ versus contrôle SN MSC NI + CPA.

4. Implication du système immunitaire *in vivo* dans la réponse au traitement par la thérapie gène suicide :

Dans nos études antérieures sur souris (Touati et al, 2014)(Amara et al., 2016), nous avons mis en évidence que notre stratégie gène suicide conduisait au développement d'une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales et médiée par les lymphocytes T CD8^+ . Nous venons également de mettre en évidence que l'utilisation comme vecteurs de cellules souches mésenchymateuses exprimant notre gène suicide et traitées au CPA induisait bien une mort immunogène des cellules tumorales *in vitro* qui pourrait donc être à l'origine de la réponse immunitaire observée *in vivo*.

Dans cette partie, nous avons évalué, *in vivo*, l'importance relative de la cytotoxicité directe dans l'efficacité de notre traitement et les cinétiques respectives des deux mécanismes. Des souris C57Bl/6 immunocompétentes ont été utilisées portant soit des

xénogreffes de cellules tumorales TC1-Luc2, exprimant la luciférase, soit des cellules tumorales exprimant le gène suicide, TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED. Les souris ont reçu ou non des injections de CPA à une dose de 90 mg/Kg, une fois par semaine pendant 4 semaines. La veille de l'administration du CPA, les souris étaient ou non traitées par des anticorps anti-CD8. Ces injections hebdomadaires permettent de supprimer les lymphocytes T CD8⁺.

Sans traitement au CPA, l'injection des anticorps anti-CD8 ne modifie pas la croissance des tumeurs exprimant ou non le gène suicide (*résultats non montrés*).

Dans un premier temps, des souris C57Bl/6 immunocompétentes portant des xénogreffes de cellules tumorales TC1-Luc2 ont été utilisées (**Figure 34**). Contrairement aux souris TC1-Luc2 traitées au CPA avec un système immunitaire dit « normal », les souris, traitées au CPA et par des anticorps anti-CD8, présentent une accélération de la croissance tumorale. En effet, celles-ci ont toutes été sacrifiées à J30 post injection des tumeurs car le volume de leur tumeur était supérieur à 2000 mm³. Nos résultats mettent également en évidence que durant le traitement au CPA, les souris avec un système immunitaire « normal » (TC1-Luc2 traitées au CPA seul) présentent un ralentissement de la croissance tumorale. Cependant dès l'arrêt du traitement au CPA, celle-ci repart. (**Figure 34**).

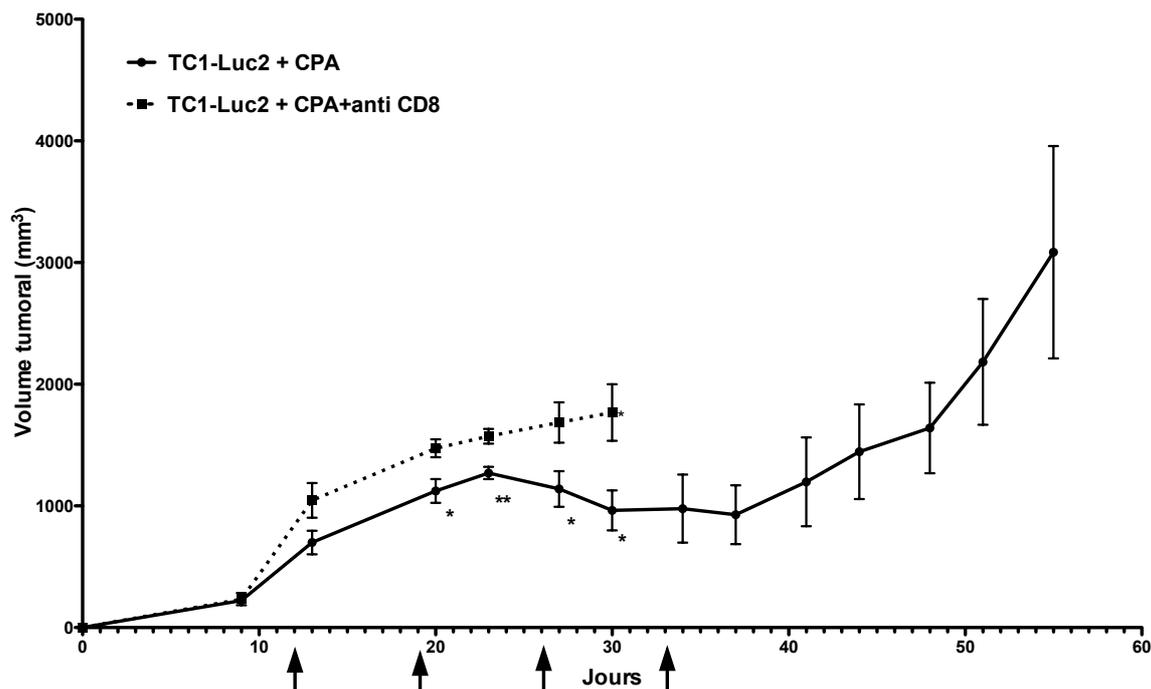


Figure 34 : Effet du CPA sur des souris xéno-gréffées avec des cellules TC1-Luc2 avec du CPA et traitées ou non par des anticorps anti-CD8.

$5 \cdot 10^5$ cellules TC1-Luc2 ont été injectées en sous-cutané dans le flanc gauche des souris C57Bl/6. Lorsque les tumeurs ont atteint 500 mm^3 environ, les souris ont reçu des injections de CPA 90 mg/Kg (4 injections i.p. à J12, J19, J26 et J33 indiquées par des flèches noires). Une partie des souris ont également reçu des injections d'anticorps anti-CD8 (pointillés noirs) un jour avant le CPA pour supprimer les lymphocytes T $CD8^+$, le reste des souris n'a pas reçu d'injections d'anticorps anti-CD8⁺ (trait noir plein). Les barres représentent les écarts types et l'analyse statistique entre les groupes a été effectuée par un test t non apparié * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Dans un second temps, des souris C57Bl/6 immunocompétentes portant des cellules tumorales exprimant le gène suicide, TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED ont été utilisées (**Figure 35**). Concernant les souris traitées au CPA, ayant des tumeurs TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED, la différence entre les deux groupes (anti-CD8 et « normal ») est plus marquée (**Figure 35**). En effet, le groupe anti-CD8 présente une accélération de la croissance tumorale par rapport aux souris non traitées par l'anticorps anti-CD8 qui ralentit après la 2^{ème} injection de CPA pour laisser place à une augmentation exponentielle du volume tumoral à partir de J23. Les souris « normales » (TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED + CPA) quant à elles, présentent une réponse positive au traitement avec tout d'abord un ralentissement de la croissance tumorale puis après la 2^{ème} injection de CPA une diminution du volume tumoral allant jusqu'à l'éradication complète des tumeurs comme vu précédemment (Touati et al., 2014a).

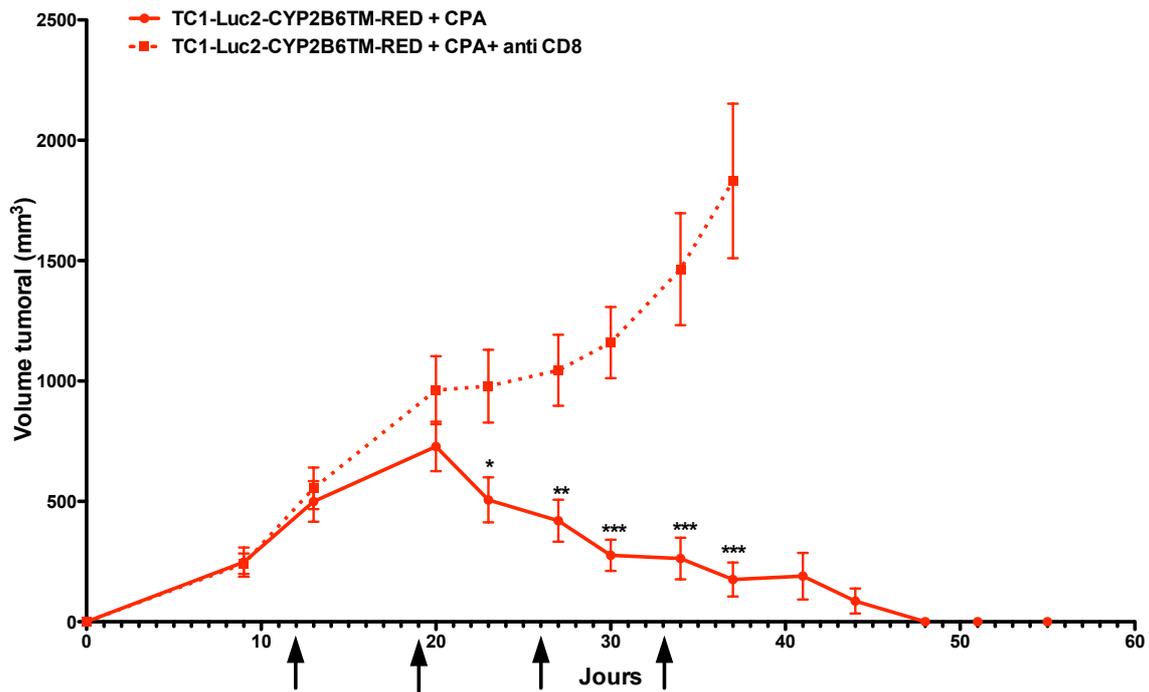


Figure 35 : Effet du CPA sur des souris xénogréffées avec des cellules TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED avec du CPA et traitées ou non par des anticorps anti-CD8.

5×10^5 cellules TC1-Luc2-CYP2B6TM-RED ont été injectées en sous-cutané dans le flanc gauche des souris C57Bl/6. Lorsque les tumeurs ont atteint 500 mm^3 environ, les souris ont reçu des injections de CPA 90 mg/Kg (4 injections i.p. à J12, J19, J26 et J33 indiquées par des flèches noires). Une partie des souris ont également reçu des injections d'anticorps anti-CD8 (pointillés rouges) un jour avant le CPA pour supprimer les lymphocytes T CD8⁺, le reste des souris n'a pas reçu d'injections d'anticorps anti-CD8+ (trait rouge plein). Les barres représentent les écarts types et l'analyse statistique entre les groupes a été effectuée par un test t non apparié * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Conclusion :

Etant donné les résultats observés lors des études de re-challenge chez la souris (**Article1**) et l'absence de métastase chez 2 des 3 lapins traités, dans le modèle lapin après une 2^{ème} injection de MSC-CYP2B6TM-RED + CPA (**Article 2**), nous voulions, dans cette partie, voir comment le système immunitaire participait à l'efficacité de notre stratégie gène suicide.

Pour cela, nous avons étudié l'effet de notre approche sur des souris immunocompétentes déplétées en CD8 à l'aide d'anticorps anti-CD8. Nos résultats ont révélé que le système immunitaire contribuait à la phase de « guérison », c'est-à-dire lors du traitement des souris par le CPA. En effet, après la 2^{ème} injection de CPA, nous avons observé une différence significative quant à l'évolution des tumeurs entre les souris « normales » et celles déplétées en CD8. (**Figures 34-35**). Notre stratégie gène suicide va déclencher une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales au cours du traitement, après 2 injections de CPA.

La première hypothèse est que la pro-drogue agirait directement sur les cellules du système immunitaire. En effet, le CPA est connu pour diminuer spécifiquement les lymphocytes Treg ce qui va permettre la levée de l'inhibition des lymphocytes T effecteurs (CD4⁺ et CD8⁺) (Lutsiak et al., 2005b; van der Most et al., 2009b). De plus, il a été montré qu'à de faibles doses répétées, le CPA pouvait aussi agir stimulant directement la prolifération et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Ge et al., 2012b; Viaud et al., 2011b). Ainsi, nos injections répétées de CPA, à raison d'une fois par semaine, pourraient stimuler le système immunitaire. Toutefois, cela n'est pas suffisant car nous devrions observer les mêmes événements dans les souris contrôles n'ayant pas le gène suicide et traitées au CPA, or ce n'est absolument pas le cas ici. Une autre hypothèse serait que notre stratégie gène suicide déclencherait une mort immunogène des cellules tumorales. En effet, la mort immunogénique, décrite par le Pr. Kroemer comme étant une mort qui se dissocie de la nécrose et de l'apoptose, alerterait le système immunitaire à l'aide de signaux libérés par les cellules mourantes afin d'être éliminées (Zitvogel et al., 2012). Cette mort immunogénique ne peut être active qu'en présence d'infiltrats lymphocytaires dans les tumeurs (Zitvogel et al., 2012). En outre, nous avons démontré précédemment l'implication

des lymphocytes T CD8⁺ dans la réponse anti-tumorale ce qui peut supposer leur présence dans l'environnement de la tumeur. **De plus, nous avons montré que le système immunitaire, particulièrement les CD8⁺, jouait un rôle dès le début du traitement des tumeurs par le CPA (3^{ème} partie, Figures 34,35).**

Il a été démontré que la mort immunogène serait induite par certaines chimiothérapies telles que l'oxaliplatine, les anthracyclines et le CPA, ainsi que par les rayons X. Nous avons donc vérifié que notre gène suicide exprimé dans les MSC couplé à un traitement au CPA permettait d'induire une mort immunogène des cellules tumorales.

Nous avons ainsi démontré qu'après un traitement de 24 heures par le surnageant des MSC, exprimant notre gène suicide et traitées au CPA, une translocation de la calréticuline à la surface des cellules tumorales avait lieu. Celle-ci va agir comme un signal « eat-me » et va alerter les cellules dendritiques non matures. Cette translocation est induite par un stress du réticulum endoplasmique qui se traduit par la translocation de la protéine ERp57 du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (**Figure 28,29**). Nous avons également observé l'induction de l'autophagie (**Figure 30-32**) qui conduit au relargage d'HMGB-1 par les cellules tumorales dans le milieu extracellulaire (**Figure 33**) dans le but d'activer les cellules dendritiques. L'autophagie serait aussi à l'origine de la libération d'ATP qui correspond à la dernière étape de la mort immunogène. Cette dernière étape reste cependant encore à démontrer dans notre stratégie gène suicide.

Au vu de tous ces résultats, nous pouvons supposer qu'une **mort immunogénique est bien présente dans notre stratégie gène suicide** couplée aux MSC.

Par conséquent, l'ensemble de mes travaux de thèse nous permet de conclure que notre **stratégie gène suicide est efficace (Articles 1 et 2)** ; et qu'elle possède un atout fort qui est **d'alerter le système immunitaire** pour détruire les cellules tumorales et empêcher le développement d'éventuelles métastases (**Figure 36**) (Résultats de la partie mort immunogénique).

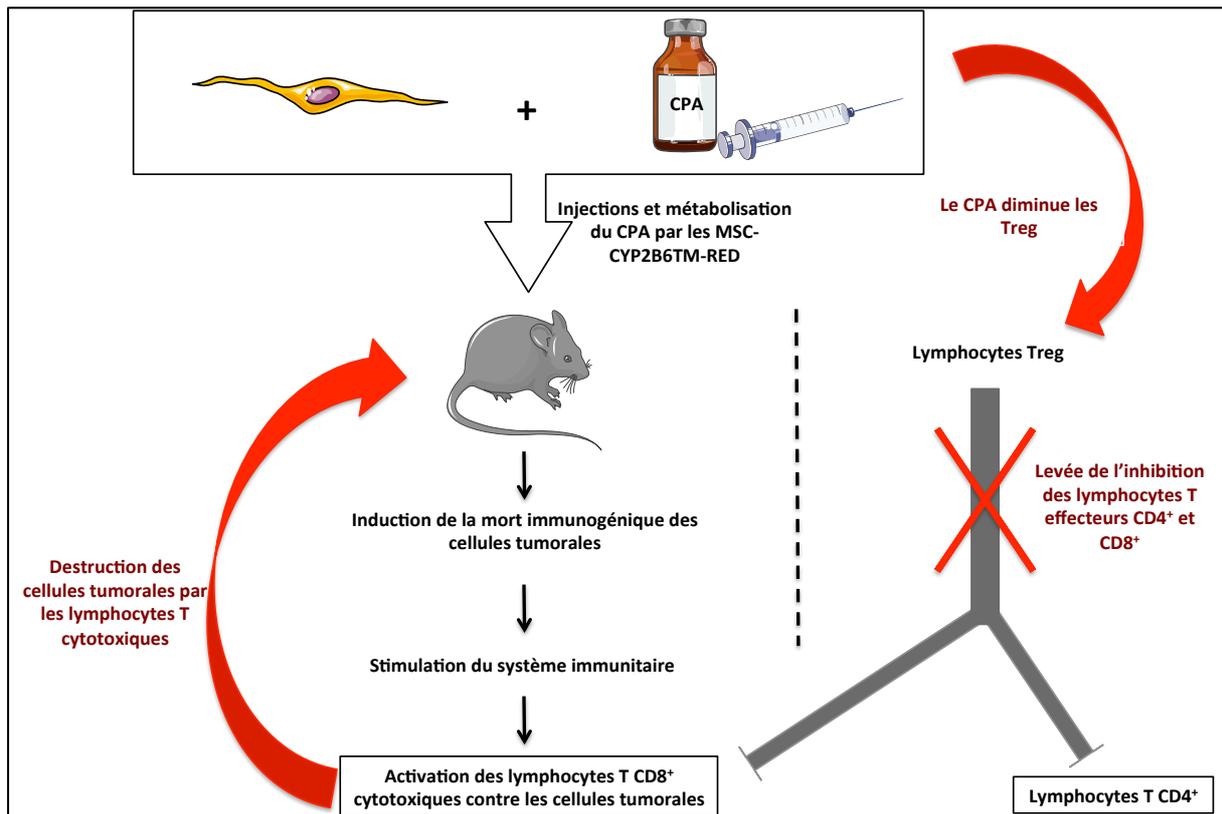


Figure 36 : Implication du système immunitaire dans notre thérapie gène suicide CYP2B6TM-RED couplé au cyclophosphamide (CPA) et transféré par les cellules souches mésenchymateuses (MSC).

Enfin, une dernière étape reste à valider : c'est l'effet vaccinateur de notre système gène suicide. Etant donné que notre traitement permet de déclencher une mort immunogénique des cellules cancéreuses conduisant au développement d'une réponse immunitaire, nous pouvons donc supposer que notre traitement agirait comme un vaccin sur le système immunitaire (Kepp et al., 2014; Kroemer et al., 2013). Pour vérifier ceci, nous allons traiter *in vitro* des cellules tumorales avec le surnageant des MSC exprimant ou non le gène suicide et traitées au CPA. Au bout de 24 heures, les cellules tumorales sont récupérées, lavées au PBS et vont être injectées à des **souris immunocompétentes** (C57Bl/6) en sous-cutané. Une semaine plus tard cette fois-ci, des cellules tumorales non traitées au CPA vont être injectées en sous-cutané à leur tour sur le flanc opposé chez les mêmes souris. Le but de cette étude sera d'observer les effets de ce traitement sur la croissance des tumeurs. **Nous pourrions ainsi voir si la 1^{ère} injection de cellules tumorales « mourantes » va stimuler le système immunitaire ce qui aura pour effet d'inhiber la croissance des cellules tumorales issues de la 2^{ème} injection.**

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Parmi les différentes approches développées pour le traitement du cancer, la Gene directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) a été très étudiée en pré-clinique depuis des années et peut désormais être évaluée en clinique. Il a été démontré que pour obtenir une efficacité optimale de cette stratégie, quatre points essentiels doivent être validés :

- Un gène codant pour une enzyme capable de métaboliser efficacement une pro-drogue en métabolite(s) toxique(s)
- Un effet “by-stander” puissant
- Une réponse immunitaire contre les cellules tumorales
- Un transfert de gène efficace conduisant à de forts niveaux d’expression du gène suicide dans la tumeur

Durant ma thèse, j’ai démontré que les cellules souches mésenchymateuses pouvaient être utilisées comme vecteurs pour notre gène suicide, le CYP2B6TM-RED, dans le traitement du cancer. Nous avons également mis en évidence une mort immunogénique des cellules tumorales qui serait à l’origine de la réponse immunitaire mise en place dans les modèles souris contre les tumeurs.

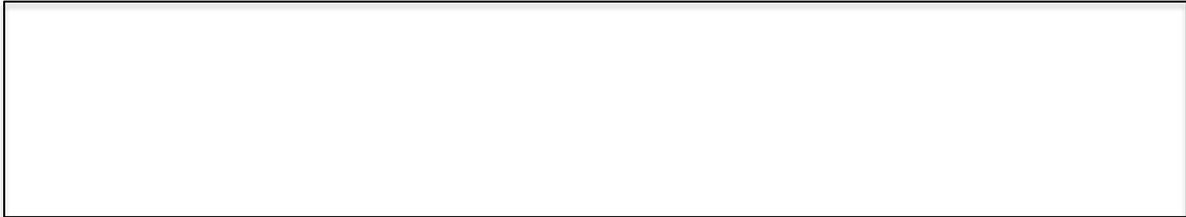
Toutefois, des modifications peuvent encore être apportées pour améliorer la thérapie par gène suicide. Celles-ci peuvent porter sur les différents axes de la stratégie :

- La toxicité : comment l’augmenter et l’étendre?
- Le système immunitaire : comment le stimuler?
- La voie d’administration des MSC : laquelle est la mieux adaptée?
- Les cellules humaines MSC : comment les développer ?

1. Comment augmenter et étendre la toxicité cellulaire ?

Notre gène suicide a l’avantage d’avoir été optimisé (Nguyen et al., 2008; Tychopoulos et al., 2005). Nous avons obtenu une activité 13 fois plus importante avec le gène de fusion CYP2B6TM-RED qu’avec le CYP2B6^{wt} (Touati et al., 2014a). Néanmoins, une augmentation de la toxicité est toujours possible. En effet, notre gène de fusion code une enzyme qui va métaboliser le CPA uniquement avec la partie cytochrome (CYP2B6TM) et également avec l’aide d’une petite quantité de réductase. Cette dernière étant en excès

dans la construction du gène de fusion, car il faut en général 1 mole de RED pour faire tourner 10 moles de CYP (Shiraki and Guengerich, 1984), l'utilisation de pro-drogues activées par la RED (Schwarz et al., 1990) peut être associée au CPA dans le traitement des cancers (Denny, 2000). Parmi, ces molécules on retrouve la mitomycin C (**Figure 37**), déjà utilisée pour traiter les cancers colorectaux, pancréatiques, du sein, de la vessie et de l'estomac, ainsi que la tirapazamine (**Figure 38**), qui est actuellement en phase III d'étude clinique.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 37 : Structure de la Mitomycin C



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 38 : Mécanismes d'activation de la Tirapazamine

La combinaison du CPA avec ces pro-drogues pourrait conduire à une plus grande production de métabolites cytotoxiques et ainsi amplifier et étendre la mortalité cellulaire *in situ*. Etant donné que ces molécules sont métabolisées uniquement en condition hypoxique par la RED, nous allons réaliser des modèles animaux pour vérifier que la combinaison de ces pro-drogues conduit à un effet synergique dans le but d'éradiquer des tumeurs.

2. Comment stimuler le système immunitaire ?

Notre thérapie gène suicide combinant les MSC-CYP2B6TM-RED avec un traitement au CPA agit sur les cellules tumorales de deux manières distinctes : d'une part via son action

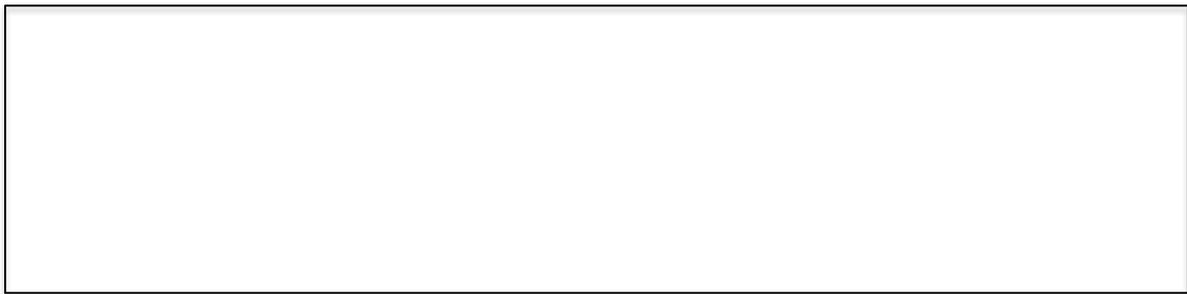
cytotoxique avec la production de métabolites actifs et l'effet "by-stander" et d'autre part via le développement d'une immunité anti-tumorale (Agard et al., 2001; Gagandeep et al., 1996)(Kuriyama et al., 2004b; Pandha et al., 2005).

De plus, notre stratégie induit une mort immunogénique des cellules tumorales qui serait probablement à l'origine du développement de cette immunité anti-tumorale. En effet, le déclenchement d'une réponse immunitaire contre les tumeurs est cruciale pour l'efficacité des chimiothérapies, pour limiter l'apparition de résistance à celles-ci et enfin pour éviter tout risque de développer des métastases (Dhodapkar, 2013; Zheng et al., 2013). Par conséquent, stimuler le développement de l'immunité anti-tumorale pourrait améliorer l'efficacité de la stratégie gène suicide. Un des moyens de le stimuler serait d'exprimer, dans les MSC, outre le gène suicide, de l'interféron γ (IFN γ) qui est impliqué dans l'activation des cellules NK et des macrophages pour éliminer les agents pathogènes intracellulaires (champignons, mycobactéries...). De plus, l'IFN γ est connu pour inhiber la croissance de nombreuses tumeurs (Miller et al., 2009) par différents mécanismes : anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, anti-angiogéniques et par la stimulation des réponses immunitaires innées et adaptatives dirigées contre les cellules tumorales (Dunn et al., 2005). Cependant, l'utilisation de l'IFN γ recombinante en clinique est limitée par sa courte demi-vie et ses importants effets secondaires (Curnis et al., 2005). Par contre, l'expression au sein de la tumeur d'IFN γ en utilisant différents vecteurs a permis d'améliorer l'efficacité du traitement tout en limitant sa toxicité générale (Dummer et al., 2010; Khammari et al., 2015; Liu et al., 2012; Wu et al., 2009). Ainsi, nous pourrions faire exprimer cette cytokine dans les cellules souches exprimant déjà le gène suicide. Des études ont déjà montré l'intérêt d'utiliser des MSC exprimant l'IFN γ dans le traitement du cancer du sein et du mélanome (Studený et al., 2002, 2004). Dans notre cas, nous allons devoir vérifier que l'expression de l'IFN γ n'a pas d'effet négatif sur l'expression du gène suicide ainsi que sur la bioactivation du CPA. Nous pourrions ensuite mesurer l'efficacité *in vivo* de la combinaison IFN γ + CY2B6TM-RED.

Une autre façon d'activer la réponse immunitaire contre les cellules tumorales est de combiner le CPA à des immunothérapies « inhibiteurs de check-point » via l'utilisation d'anticorps spécifiques de certaines voies de signalisation cellulaires (Mahoney et al., 2015). Parmi ceux-ci, les anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ont démontré leur très grande efficacité dans de nombreuses études pré-cliniques et en cliniques (Ali et al., 2016; Armand et al., 2013; Grimaldi et al., 2016; Guo et al., 2015; Kroemer and Galluzzi, 2015; Lussier et al., 2015;

Mamalis et al., 2014; Westin et al., 2014). En effet, ces anticorps agissent en bloquant l'interaction entre les lymphocytes T, via leurs récepteurs PD-1, présents dans l'infiltrat tumoral et le ligand PDL1 présents à la surface des cellules tumorales. Cette interaction permet le maintien des lymphocytes T sous leur forme inactive (**Figure 39**). Par conséquent, en l'inhibant nous permettrions un retour à la forme active des cellules T (Yang et al., 2008). Ceci signifie donc qu'il faut nécessairement avoir des infiltrats lymphocytaires dans nos tumeurs pour que ces anticorps soient efficaces.

Ainsi, l'activation des lymphocytes T CD8⁺, par la mort immunogénique ou bien par le CPA directement en inhibant les lymphocytes Treg, qui vont détruire les cellules tumorales *in situ* pourrait être amplifiée par l'utilisation de ces anticorps. Des études *in vivo* doivent être effectuées afin de valider cette hypothèse.



En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure 39 : Action des immunothérapies anti-PD1 et anti-PDL1 (Cancer Immunology: PD-1 and Beyond).

Le système immunitaire peut éliminer les cellules cancéreuses via les lymphocytes T. Cependant, les lymphocytes T sont finement régulés afin d'éviter des réactions auto-immunes. De nombreux cancers ont évolué pour détourner ces contrôles empêchant ainsi les lymphocytes T de tuer les cellules cancéreuses. Les lymphocytes T possèdent une protéine sur leur surface appelée PD-1 (en orange ci-dessus). Lorsque le récepteur PD-1 se lie au ligand PD-L1 (jaune) sur la cellule cancéreuse, les lymphocytes T se désactivent. La plupart des cellules cancéreuses présentent la protéine PD-L1 à leur surface et peuvent ainsi échapper à la mort en désactivant les lymphocytes T de cette manière. Les anticorps anti-PD-1 (Vert foncé) ou bien les anti-PD-L1 (vert clair) peuvent empêcher cette interaction et permettent aux lymphocytes T de rester actifs.

3. Quelle voie d'injection des MSC est la plus efficace ?

Nous avons évalué l'efficacité de 2 voies d'administration : **intra-tumorale** et **intra-artérielle**. L'injection intra-tumorale a montré des limites en terme de variabilité de la quantité de MSC injectées dans la tumeur, ce qui n'a permis d'obtenir que 30% de guérison chez les souris (**Article 1**). A l'inverse, l'injection intra-artérielle a montré une efficacité intéressante permettant de l'intégrer à notre thérapie gène suicide. En effet, les résultats encourageants observés avec la voie intra-artérielle (**Article 2**) nous ont conduit à définir une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de notre stratégie, l'hépatocarcinome cellulaire (HCC). Actuellement, le seul traitement curatif du HCC est la chirurgie. Cependant, seulement 20 à 30% des patients sont éligibles à ce type d'opération. De plus, dans le cas de métastases hépatiques du cancer du colon, un fort taux de rechute (environ 60%) est associé à la résection de la métastase (Lafaro et al., 2016; Tzeng and Aloia, 2013). Le modèle Vx2, chez le lapin, est couramment utilisé comme modèle pour les HCC. Les Vx2 sont des tumeurs très agressives qui métastasent de façon très importante. (Lee et al., 2009).

Ainsi, des mises au point doivent être réalisées dans le but de déterminer quelles sont les conditions optimales de traitement pour obtenir la meilleure efficacité possible. Dans ce but, nous allons réaliser différentes études chez le lapin développant des tumeurs Vx2 dans lesquelles nous allons faire varier un paramètre à la fois. En effet, la première étude portera sur la quantité de CPA afin d'analyser sa toxicité et son efficacité à différentes doses. Une fois déterminée, nous pourrions augmenter la quantité de MSC ainsi que le nombre d'injections. Par ailleurs, le délai entre l'injection des MSC et le traitement devra également être étudié.

Autre point essentiel, nous avons travaillé sur des tumeurs artificielles (orthotopiques ou non) dans tous nos modèles animaux, or celles-ci présentent un microenvironnement tumoral différent de celui des tumeurs spontanées ou « naturelles ». C'est dans ce but précis que nous sommes entrés en contact avec une clinique vétérinaire qui réalise des études « cliniques » sur des chiens développant des tumeurs spontanées (Tierny et al., 2015; Yu et al., 2011). En effet, depuis plus de 10 ans, les études cliniques sur les chiens se sont développées principalement dans le domaine du cancer car il existe très peu de molécules anti-cancéreuses mises sur le marché en clinique vétérinaire. Or, la première cause de mortalité chez le chien est le cancer. De ce fait, les essais cliniques sur les chiens sont en

pleine émergence car d'une part, ils offrent une possibilité de traitement et, dans le meilleur des cas, de guérison pour les animaux et d'autre part, ils auraient un avantage considérable pour le développement de nouvelles molécules (Grimm, 2016). Ces essais cliniques, de phase « 0 », seraient une étape clé entre les études pré-cliniques (*in vitro* et *in vivo* sur les rongeurs et une autre espèce) et les études cliniques chez l'Homme. Les avantages du modèle canin sont que les chiens présentent les mêmes pathologies que l'Homme, dont le cancer et qu'ils sont soumis aux mêmes facteurs de risques : environnement (pollution, tabac...), nourritures parfois identiques (Grimm, 2016). Cependant, le développement des tumeurs est plus rapide chez le chien que chez l'Homme (6 mois versus 3 ans) ce qui facilite et raccourcit les études. Les chiens présentent une diversité génétique tout comme l'Homme en clinique, ce qui constitue un modèle plus réaliste que les études sur les rongeurs. Autre argument, les outils diagnostiques utilisés chez le chien sont identiques à ceux utilisés chez l'être humain. De plus, la taille de l'animal est plus proche de celle de l'Homme (allant de 5 Kg pour les plus petits jusqu'à 70 Kg pour les plus gros) ainsi les doses utilisées seront proches de celles administrées chez l'Homme. Concernant le coût de ces modèles canins, ils sont 10 fois moins coûteux qu'un essai clinique chez l'Homme, mais 10 fois plus coûteux qu'une étude sur des souris (Paoloni and Khanna, 2008). Ces essais cliniques canins ont une importance capitale dans le développement de nouveaux médicaments. Néanmoins, ils ne remplaceront pas les modèles murins qui restent indispensables. L'association des deux modèles permettrait une meilleure évaluation du médicament (métabolisme, pharmacocinétique, toxicité, activité, protocole d'administration...), d'accélérer le développement d'essais chez l'Homme (Paoloni and Khanna, 2008) et peut-être de développer des produits vétérinaires.

Cette étude réalisée dans le but de pouvoir effectuer des « essais cliniques » chez des chiens présentant des carcinomes hépato-cellulaires pourra, en fonction des résultats obtenus, servir de tremplin pour un passage en clinique humaine (Phase I).

4. Comment développer des MSC humaines ? Greffe allologue ou autologue ?

Une des caractéristiques essentielles des MSC est qu'elles n'expriment pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II à leur surface et expriment faiblement ceux du CMH-I (Griffin et al., 2010; Koppula et al., 2009). Par

conséquent, les MSC ne sont donc pas détectées par le système immunitaire. Nous pouvons imaginer développer une lignée humaine de MSC à partir d'un donneur sain qui exprimera le gène suicide à de forts niveaux. L'utilisation des MSC allogéniques serait un gain de temps important pour les patients étant donné qu'il faut compter 1 à 2 mois pour développer un pool de MSC prélevé directement chez le patient exprimant le gène (en autologue). Or ces patients, souvent à un stade avancé, ne peuvent se permettre d'attendre aussi longtemps avant de recevoir un traitement.

Dans l'éventualité d'une application chez l'Homme, nous allons devoir développer des MSC humaines en qualité GMP. Cette étape est indispensable et requiert des locaux adaptés pour une production en masse de MSC ainsi que de lentivirus qui permettront la transduction des cellules et donc l'expression du gène suicide. Ainsi, il sera essentiel d'établir un protocole de transduction efficace et surtout reproductible qui conduira à de forts niveaux d'expression du gène suicide dans les MSC. Une autre possibilité pourrait être également d'utiliser un autre mode d'insertion que la transduction virale afin d'éviter le risque potentiel d'insérer des séquences virales dans les MSC. En effet, le système CRISPR-Cas9 offre cette capacité d'insérer une séquence d'ADN et surtout de choisir la région d'insertion au sein de la cellule hôte (Jinek et al., 2012). Actuellement, peu d'études ont utilisé ce système pour l'insertion de gène dans les cellules (Bachu et al., 2015). Néanmoins, les recherches sur CRISPR-Cas9 sont en pleine expansion (Ceasar et al., 2016; Guan et al., 2016; Mali et al., 2013; Ran et al., 2013)

5. Quels sont les différents aspects réglementaires à valider avant tout essai clinique chez l'Homme?

Du point de vue de la réglementation européenne, EMA (European Medicines Agency), et française, ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), des critères doivent être approuvés avant de pouvoir administrer un médicament à l'Homme. Ces études ont pour but de limiter tout risque d'effets secondaires qui contrebalanceraient l'effet thérapeutique attendu. Dans un premier temps, nous devons classer notre stratégie gène suicide (CYP2B6TM-RED) vectorisé par les MSC et couplé à un traitement au CPA,. En effet, notre stratégie combine à la fois la thérapie génique par l'insertion du gène suicide mais également de la thérapie cellulaire par l'utilisation des

cellules souches MSC. Il faut donc tenir compte de ces 2 types de thérapies qui devront valider plusieurs aspects réglementaires. Toutefois, beaucoup de points sont communs à ces thérapies, avec néanmoins plus d'exigences pour la thérapie génique. Nous avons donc décidé de qualifier notre stratégie de **thérapie génique**.

Ainsi, dans le cadre de ce type de thérapie, les points suivant restent à clarifier.

- Le choix de la dose : Il faut déterminer la dose létale 50 (DL50) à partir de laquelle une toxicité est observée et conduit à la mortalité de 50% des animaux. Ces études doivent être réalisées avec une gamme de dose de CPA en partant de celle à partir de laquelle un effet thérapeutique est observé.
- La toxicité : Ces études sont très importantes et doivent être réalisées en suivant le même protocole que celui prévu en clinique. Elles peuvent être menées sur une ou plusieurs espèces (meilleures conditions).
- L'intégration du gène : Il faut étudier l'intégration et la localisation du gène suicide dans les MSC et également son intégration probable dans les organes et tissus non cibles chez l'animal.
- La transmission germinale : Il faut déterminer s'il existe un risque de transfert du gène suicide aux lignées germinales.
- L'immunogénicité et l'immunotoxicité : Il faut étudier le potentiel d'immunogénicité des MSC et du gène suicide, ainsi que l'immunité probable des MSC après plusieurs injections chez l'animal.

En plus de ces critères à tester, d'autres études doivent aussi être effectuées et sont spécifiques à l'utilisation des cellules souches transduites. Parmi ces aspects, nous devons vérifier :

- La libération du vecteur *in vivo* : Il nous faut confirmer qu'il n'y ait pas de risque de dissémination du virus dans les tissus et organes, en particulier dans les gonades, et dans l'environnement. La capacité de réplication et l'intégration du virus dans les MSC doivent être également examinées.
- L'induction de changement cellulaire: Il nous faut étudier l'effet de la transduction des MSC, par le lentivirus, sur la morphologie cellulaire, le phénotype, la fonction et le comportement.

Dans ce but nous sommes donc entrés en contact avec une CRO (Contract Research Organization) afin de réaliser la majorité de ces analyses et principalement les études toxicologiques. Celles-ci ont un coût assez conséquent ce qui nécessite la recherche de financements.

Nous sommes conscient que le chemin est encore long avant de pouvoir atteindre les essais cliniques chez l'Homme (*First-in-man*).

6. Quelles sont les alternatives possibles pour notre stratégie gène suicide ?

En parallèle des études sur les cellules souches mésenchymateuses utilisées comme vecteurs pour notre gène suicide, nous avons eu la possibilité de tester un autre vecteur : il s'agit du Poxvirus. Pour cela, nous sommes entrés en contact avec la société Transgene qui développe des traitements contre les cancers mais aussi contre certaines pathologies infectieuses (Hépatites B chronique, tuberculose...). Un de leurs produits phares est le virus de la vaccine, ou poxvirus, avec lequel ils vectorisent différents gènes : GM-CSF pour l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale des tumeurs solides et FCU1 qui code pour la protéine de fusion CD:UPRT qui est utilisée en traitement contre les tumeurs solides http://www.transgene.fr/?page_id=11682&lang=fr#pipelinechart. Nous avons collaboré avec eux (MTA) pour qu'ils puissent tester l'efficacité de notre gène suicide exprimé dans leur poxvirus. Transgene réalise actuellement les études *in vitro* et réalisera les études *in vivo* sur différents modèles de tumeurs humaines. Les avantages du poxvirus sont qu'il présente une grande capacité d'expression de gène sans intégration au génome de la cellule hôte. De plus, l'enveloppe du poxvirus a été modifiée afin qu'il puisse s'exprimer dans les tumeurs uniquement. Après injection par voie intraveineuse, le virus pourra aussi se répliquer (réplication épisomale) et se propager au niveau du site tumoral. Nous attendons de voir ce que donne les essais sur les souris puis, par la suite, nous pourrions comparer l'efficacité du poxvirus avec celle des MSC exprimant notre gène suicide.

Au-delà de traiter les tumeurs solides, notre stratégie gène suicide présente aussi une sécurité essentielle puisque les premières cellules détruites par le CPA seront celles qui exprimeront le gène suicide. De ce point de vue, nous pouvons imaginer utiliser notre gène suicide comme un système de contrôle des cellules qui enclencherait leur autodestruction par un simple traitement au CPA. Cette fonction pourrait avoir un intérêt dans les

immunothérapies cellulaires impliquant les lymphocytes T (CAR-T) (June et al., 2014). En effet, un des effets secondaires grave de ces thérapies est le « syndrome de libération des cytokines ». Ce relargage intense de cytokines dans l'organisme va conduire dans certains cas extrêmes au coma des patients (Uttenthal et al., 2012). Ainsi, nous pourrions utiliser notre gène suicide en le faisant s'exprimer dans les CAR-T permettant de les éliminer avec un traitement au CPA dans le cas où ils entraîneraient un effet toxique grave et non supportable par le malade.

Malgré l'efficacité pré-clinique démontré de la thérapie gène suicide, les essais cliniques ont montré des résultats peu probants, mettant en évidence des défauts des systèmes enzyme/pro-drogue. La faiblesse des combinaisons enzyme/pro-drogue réside dans le fait que dans la majorité des cas les études *in vivo* ont été faites sur des souris *nude*, ce qui ne permet donc pas de voir si une éventuelle réponse immunitaire est présente. Un autre point important est que les stratégies gène suicide dont le métabolite actif est phosphorylé, telles que HSV-TK/GCV, CD : UPRT/5-FC et DCK/Gemcitabine, présentent un effet "by-stander" qui est dépendant des jonctions communicantes. Ceci a pour conséquence de limiter la diffusion du métabolite à travers les cellules, car ces jonctions sont inactivées dans la majorité des tumeurs, donc l'effet "by-stander" est peu efficace. En outre, peu d'études ont été faites sur l'amélioration de l'activité catalytique de l'enzyme.

Ainsi, mon travail de thèse a permis de montrer que notre système amélioré CYP2B6TM-RED/CPA pouvait être vectorisé efficacement par des cellules souches mésenchymateuses, MSC, *in vitro* et *in vivo*, et présentait un effet "by-stander" puissant. De plus, le système immunitaire est grandement impliqué dans notre stratégie, *in vitro* et *in vivo*. Pour conclure, notre stratégie gène suicide : MSC-CYP2B6TM-RED/CPA possède tous les outils nécessaires pour un développement futur en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Astri-Roques, S., Elabd, C., Ailhaud, G., and Amri, E.-Z. (2004). Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp. Cell Res.* *293*, 219–228.

Aboody, K.S., Najbauer, J., and Danks, M.K. (2008). Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther.* *15*, 739–752.

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 Ther.* *8*, 128–136.

Aguilar, L.K., Guzik, B.W., and Aguilar-Cordova, E. (2011a). Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development. *J. Cell. Biochem.* *112*, 1969–1977.

Aguilar, L.K., Guzik, B.W., and Aguilar-Cordova, E. (2011b). Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development. *J. Cell. Biochem.* *112*, 1969–1977.

Ahi, Y.S., Bangari, D.S., and Mittal, S.K. (2011). Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Curr. Gene Ther.* *11*, 307–320.

Ali, O.A., Lewin, S.A., Dranoff, G., and Mooney, D.J. (2016). Vaccines Combined with Immune Checkpoint Antibodies Promote Cytotoxic T-cell Activity and Tumor Eradication. *Cancer Immunol. Res.* *4*, 95–100.

Amara, I., Pramil, E., Senamaud-Beaufort, C., Devillers, A., Macedo, R., Lescaille, G., Seguin, J., Tartour, E., Lemoine, F., Beaune, P., et al. (2016). Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* *227*, 271–278.

Andrade-Rozental, A.F., Rozental, R., Hopperstad, M.G., Wu, J.K., Vrionis, F.D., and Spray, D.C. (2000). Gap junctions: the “kiss of death” and the “kiss of life.” *Brain Res. Brain Res. Rev.* *32*, 308–315.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007a). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* *13*, 1050–1059.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007b). Toll-like receptor 4-dependent contribution of

the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* *13*, 1050–1059.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.-P., Delaloge, S., et al. (2007c). The interaction between HMGB-1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* *220*, 47–59.

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 Ther.* *17*, 86–96.

Ardiani, A., Johnson, A.J., Ruan, H., Sanchez-Bonilla, M., Serve, K., and Black, M.E. (2012a). Enzymes to die for: exploiting nucleotide metabolizing enzymes for cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *12*, 77–91.

Ardiani, A., Johnson, A.J., Ruan, H., Sanchez-Bonilla, M., Serve, K., and Black, M.E. (2012b). Enzymes to die for: exploiting nucleotide metabolizing enzymes for cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* *12*, 77–91.

Ariyoshi, N., Ohara, M., Kaneko, M., Afuso, S., Kumamoto, T., Nakamura, H., Ishii, I., Ishikawa, T., and Kitada, M. (2011). Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *39*, 2045–2048.

Armand, P., Nagler, A., Weller, E.A., Devine, S.M., Avigan, D.E., Chen, Y.-B., Kaminski, M.S., Holland, H.K., Winter, J.N., Mason, J.R., et al. (2013). Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 4199–4206.

Augello, A., Kurth, T.B., and De Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cell. Mater.* *20*, 121–133.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.

Awwad, M., and North, R.J. (1988). Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden. *Immunology* *65*, 87–92.

Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., Smyth, M.J., and Zitvogel, L. (2010). Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* *70*, 855–858.

Bachu, R., Bergareche, I., and Chasin, L.A. (2015). CRISPR-Cas targeted plasmid integration into mammalian cells via non-homologous end joining. *Biotechnol. Bioeng.* *112*, 2154–2162.

- Balzarini, J., Bohman, C., and De Clercq, E. (1993). Differential mechanism of cytostatic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 or type 2. *J. Biol. Chem.* *268*, 6332–6337.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.
- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* *22*, 1856–1864.
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Colombo, F., and Palù, G. (2009). HSV-TK/IL-2 gene therapy for glioblastoma multiforme. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *542*, 529–549.
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., and Fehse, B. (2006). Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* *17*, 253–263.
- Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Meyer, E., Uckert, W., and Debatin, K.M. (1999). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 8699–8704.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* *27*, 20–21.
- Benson, J.M., and Nahata, M.C. (1988). Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin. Pharm.* *7*, 424–438.
- Bessis, N., GarciaCozar, F.J., and Boissier, M.-C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* *11 Suppl 1*, S10–17.
- Bexell, D., Gunnarsson, S., Tormin, A., Darabi, A., Gisselsson, D., Roybon, L., Scheduling, S., and Bengzon, J. (2009). Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 183–190.
- Bi, Y., Ehrchiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.-M., Zhang, L., et al. (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat. Med.* *13*, 1219–1227.
- Bianchi, M.E. (2014). Killing cancer cells, twice with one shot. *Cell Death Differ.* *21*, 1–2.
- Bianco, P. (2014). “Mesenchymal” stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 677–704.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* *2*, 313–319.

Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C.J., Padovan, C.S., Schichor, C., Goldbrunner, R., and Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J. Neurooncol.* *83*, 241–247.

Black, M.E., Kokoris, M.S., and Sabo, P. (2001). Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Cancer Res.* *61*, 3022–3026.

Blanpain, C., Horsley, V., and Fuchs, E. (2007). Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell* *128*, 445–458.

Blumenthal, M., Skelton, D., Pepper, K.A., Jahn, T., Methangkool, E., and Kohn, D.B. (2007). Effective suicide gene therapy for leukemia in a model of insertional oncogenesis in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *15*, 183–192.

Bondanza, A., Hambach, L., Aghai, Z., Nijmeijer, B., Kaneko, S., Mastaglio, S., Radrizzani, M., Fleischhauer, K., Ciceri, F., Bordignon, C., et al. (2011). IL-7 receptor expression identifies suicide gene-modified allospecific CD8⁺ T cells capable of self-renewal and differentiation into antileukemia effectors. *Blood* *117*, 6469–6478.

Bouard, D., Alazard-Dany, D., and Cosset, F.-L. (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* *157*, 153–165.

Bouffard, D.Y., and Momparler, R.L. (1995). Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk. Res.* *19*, 849–856.

Bouffard, D.Y., Laliberté, J., and Momparler, R.L. (1993). Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* *45*, 1857–1861.

Bourin, P., Gadelorge, M., Peyrafitte, J.-A., Fleury-Cappellesso, S., Gomez, M., Rage, C., and Sensebé, L. (2008). Mesenchymal Progenitor Cells: Tissue Origin, Isolation and Culture. *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie* *35*, 160–167.

Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K., and Gimble, J.M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* *15*, 641–648.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7297–7301.

Bower, M., Palmieri, C., and Dhillon, T. (2006). AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *19*, 14–19.

- 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. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 1512–1520.
- Bruix, J., Reig, M., and Sherman, M. (2016). Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* *150*, 835–853.
- Bukrinsky, M.I., and Haffar, O.K. (1999). HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *4*, D772-781.
- Burkholder, B., Huang, R.-Y., Burgess, R., Luo, S., Jones, V.S., Zhang, W., Lv, Z.-Q., Gao, C.-Y., Wang, B.-L., Zhang, Y.-M., et al. (2014). Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim. Biophys. Acta* *1845*, 182–201.
- Burrack, K.S., Tan, J.J.L., McCarthy, M.K., Her, Z., Berger, J.N., Ng, L.F.P., and Morrison, T.E. (2015). Myeloid Cell Arg1 Inhibits Control of Arthritogenic Alphavirus Infection by Suppressing Antiviral T Cells. *PLOS Pathog* *11*, e1005191.
- Buscail, L., Bournet, B., Vernejoul, F., Cambois, G., Lulka, H., Hanoun, N., Dufresne, M., Meulle, A., Vignolle-Vidoni, A., Ligat, L., et al. (2015a). First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings. *Mol. Ther.* *23*, 779–789.
- Buscail, L., Bournet, B., Vernejoul, F., Cambois, G., Lulka, H., Hanoun, N., Dufresne, M., Meulle, A., Vignolle-Vidoni, A., Ligat, L., et al. (2015b). First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings. *Mol. Ther.* *23*, 779–789.
- Campos, S.K., and Barry, M.A. (2007). Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Curr. Gene Ther.* *7*, 189–204.
- Candolfi, M., Yagiz, K., Foulad, D., Alzadeh, G.E., Tesarfreund, M., Muhammad, A.K.M.G., Puntel, M., Kroeger, K.M., Liu, C., Lee, S., et al. (2009). Release of HMGB-1 in response to proapoptotic glioma killing strategies: efficacy and neurotoxicity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4401–4414.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* *9*, 641–650.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* *213*, 341–347.
- Cesar, S.A., Rajan, V., Prykhozhij, S.V., Berman, J.N., and Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 2333–2344.
- Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1538–1543.

- Cereseto, A., and Giacca, M. (2004). Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev.* 6, 13–21.
- Chang, E., Chalikonda, S., Friedl, J., Xu, H., Phan, G.Q., Marincola, F.M., Alexander, H.R., and Bartlett, D.L. (2005). Targeting vaccinia to solid tumors with local hyperthermia. *Hum. Gene Ther.* 16, 435–444.
- 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 Res.* 53, 5629–5637.
- Chao, M.P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A.A., Gentles, A.J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S.B., Raveh, T., Park, C.Y., et al. (2010). Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2, 63ra94.
- Chen, S., Fang, W., Ye, F., Liu, Y.-H., Qian, J., Shan, S., Zhang, J., Chunhua, R.Z., Liao, L., 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. *Am. J. Cardiol.* 94, 92–95.
- Chuah, M.K., Nair, N., and VandenDriessche, T. (2012). Recent progress in gene therapy for hemophilia. *Hum. Gene Ther.* 23, 557–565.
- Cihova, M., Altanerova, V., and Altaner, C. (2011). Stem cell based cancer gene therapy. *Mol. Pharm.* 8, 1480–1487.
- Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr. Gene Ther.* 8, 419–429.
- Conrad, C., Hüsemann, Y., Niess, H., von Luetlichau, I., Huss, R., Bauer, C., Jauch, K.-W., Klein, C.A., Bruns, C., and Nelson, P.J. (2011). Linking transgene expression of engineered mesenchymal stem cells and angiopoietin-1-induced differentiation to target cancer angiogenesis. *Ann. Surg.* 253, 566–571.
- Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demaux, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R., and Dedhar, S. (1997). Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386, 843–847.
- 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. *Mol. Cancer* 9, 141.
- Coura, R. dos S., and Nardi, N.B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Viol. J.* 4, 99.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.

- 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. *Hum. Gene Ther.* *12*, 1594–1596.
- Cupedo, T., Nagasawa, M., Weijer, K., Blom, B., and Spits, H. (2005). Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur. J. Immunol.* *35*, 383–390.
- Curnis, F., Gasparri, A., Sacchi, A., Cattaneo, A., Magni, F., and Corti, A. (2005). Targeted delivery of IFN γ to tumor vessels uncouples antitumor from counterregulatory mechanisms. *Cancer Res.* *65*, 2906–2913.
- Curran, M.A., Kaiser, S.M., Achacoso, P.L., and Nolan, G.P. (2000). Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *1*, 31–38.
- Dachs, G.U., Hunt, M.A., Syddall, S., Singleton, D.C., and Patterson, A.V. (2009). Bystander or no bystander for gene directed enzyme prodrug therapy. *Mol. Basel Switz.* *14*, 4517–4545.
- Davison, A.J., Benko, M., and Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* *84*, 2895–2908.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* *44*, 1928–1942.
- Deans, R.J., and Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* *28*, 875–884.
- Deng, L.-Y., Wang, J.-P., Gui, Z.-F., and Shen, L.-Z. (2011). Antitumor activity of mutant bacterial cytosine deaminase gene for colon cancer. *World J. Gastroenterol.* *17*, 2958–2964.
- Denny, W.A. (2000). The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol.* *1*, 25–29.
- 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. Pa* *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.
- Dilber, M.S., and Smith, C.I. (1997). Suicide genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther.* *4*, 273–274.
- Ding, X., and Kaminsky, L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *43*, 149–173.

Domin, B.A., Mahony, W.B., and Zimmerman, T.P. (1993). Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 503–510.

Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., de Lima, M.C.P., and Pierrefite-Carle, V. (2012). Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett.* *324*, 160–170.

Dummer, R., Eichmüller, S., Gellrich, S., Assaf, C., Dreno, B., Schiller, M., Dereure, O., Baudard, M., Bagot, M., Khammari, A., et al. (2010). Phase II clinical trial of intratumoral application of TG1042 (adenovirus-interferon-gamma) in patients with advanced cutaneous T-cell lymphomas and multilesional cutaneous B-cell lymphomas. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *18*, 1244–1247.

Dunn, G.P., Ikeda, H., Bruce, A.T., Koebel, C., Uppaluri, R., Bui, J., Chan, R., Diamond, M., White, J.M., Sheehan, K.C.F., et al. (2005). Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol. Res.* *32*, 231–245.

Eck, S.L., Alavi, J.B., Alavi, A., Davis, A., Hackney, D., Judy, K., Mollman, J., Phillips, P.C., Wheeldon, E.B., and Wilson, J.M. (1996). Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Hum. Gene Ther.* *7*, 1465–1482.

Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J. Exp. Med.* *200*, 277–285.

Emadi, A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *6*, 638–647.

Engelmann, C., Heslan, J.M., Fabre, M., Lagarde, J.P., Klatzmann, D., and Panis, Y. (2002). Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors. *Cancer Lett.* *179*, 59–69.

Erbs, P., Findeli, A., Kintz, J., Cordier, P., Hoffmann, C., Geist, M., and Balloul, J.-M. (2008). Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* *15*, 18–28.

Faucette, S.R., Zhang, T.-C., Moore, R., Sueyoshi, T., Omiecinski, C.J., LeCluyse, E.L., Negishi, M., and Wang, H. (2007). Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *320*, 72–80.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7413–7417.

Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.-S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 704–712.

- Fenner, F. (1982). A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev. Infect. Dis.* 4, 916–930.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 259–269.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Fox, M.E., Lemmon, M.J., Mauchline, M.L., Davis, T.O., Giaccia, A.J., Minton, N.P., and Brown, J.M. (1996). Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther.* 3, 173–178.
- Fraley, R., Subramani, S., Berg, P., and Papahadjopoulos, D. (1980). Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.* 255, 10431–10435.
- Frank, D.K., Frederick, M.J., Liu, T.J., and Clayman, G.L. (1998). Bystander effect in the adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy model of human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 2521–2528.
- Freed, E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 13–33.
- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L., and Abraham, G.N. (1993). The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53, 5274–5283.
- Freeman, S.M., Ramesh, R., and Marrogi, A.J. (1997). Immune system in suicide-gene therapy. *Lancet Lond. Engl.* 349, 2–3.
- Friedenstein, A.J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol. Blood Transfus.* 25, 19–29.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 381–390.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968a). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968b). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393–403.

- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974a). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331–340.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luriá, E.A., and Ruadkow, I.A. (1974b). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2, 83–92.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Fuchita, M., Ardiani, A., Zhao, L., Serve, K., Stoddard, B.L., and Black, M.E. (2009). Bacterial cytosine deaminase mutants created by molecular engineering show improved 5-fluorocytosine-mediated cell killing in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 69, 4791–4799.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65–70.
- 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 Ther.* 3, 83–88.
- Gallois-Montbrun, S., Veron, M., and Deville-Bonne, D. (2004). Antiviral nucleoside analogs phosphorylation by nucleoside diphosphate kinase. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 361–369.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–120.
- Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J.A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., Garcia-Arranz, M., and Pascual, M. (2009). Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis. Colon Rectum* 52, 79–86.
- Garg, A.D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., and Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 53–71.
- Garg, A.D., Krysko, D.V., Vandenabeele, P., and Agostinis, P. (2012a). Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 215–221.
- Garg, A.D., Krysko, D.V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G.B., Marysael, T., Rubio, N., Firczuk, M., Mathieu, C., Roebroek, A.J.M., et al. (2012b). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* 31, 1062–1079.

Garg, A.D., Dudek, A.M., Ferreira, G.B., Verfaillie, T., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Mathieu, C., and Agostinis, P. (2013a). ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy* 9, 1292–1307.

Garg, A.D., Dudek, A.M., Ferreira, G.B., Verfaillie, T., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Mathieu, C., and Agostinis, P. (2013b). ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy* 9, 1292–1307.

Garg, A.D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R.B., Bravo-San Pedro, J.M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., et al. (2015). Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol.* 6, 588.

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.

Ge, Y., Domschke, C., Stoiber, N., Schott, S., Heil, J., Rom, J., Blumenstein, M., Thum, J., Sohn, C., Schneeweiss, A., et al. (2012a). Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 353–362.

Ge, Y., Domschke, C., Stoiber, N., Schott, S., Heil, J., Rom, J., Blumenstein, M., Thum, J., Sohn, C., Schneeweiss, A., et al. (2012b). Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 353–362.

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.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P.E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., and Chauffert, B. (2007). 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.* CII 56, 641–648.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15, 1170–1178.

Giacca, M., and Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161, 377–388.

Gilardini Montani, M.S., D'Eliseo, D., Cirone, M., Di Renzo, L., Faggioni, A., Santoni, A., and Velotti, F. (2015). Capsaicin-mediated apoptosis of human bladder cancer cells activates dendritic cells via CD91. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 31, 578–581.

- 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 Opin. Drug Metab. Toxicol.* *6*, 919–938.
- Godbey, W.T., Wu, K.K., and Mikos, A.G. (1999). Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* *45*, 268–275.
- Gómez, C.E., Nájera, J.L., Krupa, M., Perdiguero, B., and Esteban, M. (2011). MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* *11*, 189–217.
- Götherström, C., Ringdén, O., Tammik, C., Zetterberg, E., Westgren, M., and Le Blanc, K. (2004). Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *190*, 239–245.
- Graham, F.L., and Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* *3*, 207–220.
- Greco, O., and Dachs, G.U. (2001). Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J. Cell. Physiol.* *187*, 22–36.
- Greco, O., Folkes, L.K., Wardman, P., Tozer, G.M., and Dachs, G.U. (2000). Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. *Cancer Gene Ther.* *7*, 1414–1420.
- Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2012). Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol.* *507*, 229–254.
- Griffin, M.D., Ritter, T., and Mahon, B.P. (2010). Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum. Gene Ther.* *21*, 1641–1655.
- Grimaldi, A.M., Marincola, F.M., and Ascierto, P.A. (2016). Single versus combination immunotherapy drug treatment in melanoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* *16*, 433–441.
- Grimm, D. (2016). From bark to bedside. *Science* *353*, 638–640.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* *21*, 589–601.
- Gruber, J., Geisen, F., Sgonc, R., Egle, A., Villunger, A., Boeck, G., Konwalinka, G., and Greil, R. (1996). 2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) induces apoptosis in myeloma cell lines resistant to steroids and 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Stem Cells Dayt. Ohio* *14*, 351–362.
- Guan, L., Han, Y., Zhu, S., and Lin, J. (2016). Application of CRISPR-Cas system in gene therapy: Pre-clinical progress in animal model. *DNA Repair*.
- Guengerich, F.P. (2015). Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450*, P.R. Ortiz de Montellano, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 523–785.

- Guo, Z., Wang, H., Meng, F., Li, J., and Zhang, S. (2015). Combined Trabectedin and anti-PD1 antibody produces a synergistic antitumor effect in a murine model of ovarian cancer. *J. Transl. Med.* *13*, 247.
- Guse, K., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2011). Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 595–608.
- Hacein-Bey Abina, S., Gaspar, H.B., Blondeau, J., Caccavelli, L., Charrier, S., Buckland, K., Picard, C., Six, E., Himoudi, N., Gilmour, K., et al. (2015). Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA* *313*, 1550–1563.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* *302*, 415–419.
- Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., Hanifin, J.M., and Slifka, M.K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* *9*, 1131–1137.
- He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *25*, 377–406.
- He, Z.-Y., Wei, X.-W., Luo, M., Luo, S.-T., Yang, Y., Yu, Y.-Y., Chen, Y., Ma, C.-C., Liang, X., Guo, F.-C., et al. (2013). Folate-linked lipoplexes for short hairpin RNA targeting claudin-3 delivery in ovarian cancer xenografts. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *172*, 679–689.
- Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A.-K., Giebel, B., Lang, S., and Brandau, S. (2010). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *19*, 693–706.
- Hermiston, T.W., and Kuhn, I. (2002). Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Ther.* *9*, 1022–1035.
- Hesse, L.M., Venkatakrisnan, K., Court, M.H., von Moltke, L.L., Duan, S.X., Shader, R.I., and Greenblatt, D.J. (2000). CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *28*, 1176–1183.
- Hodgson, E., and Rose, R.L. (2007). The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol. Ther.* *113*, 420–428.
- Hoffman, S.M., Nelson, D.R., and Keeney, D.S. (2001). Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics* *11*, 687–698.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 8932–8937.

- Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh lji, H.J., Kang, R., Lotze, M.T., and Tang, D. (2013). Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death Dis.* *4*, e966.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4335–4340.
- Huang, P., and Plunkett, W. (1992). A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal. Biochem.* *207*, 163–167.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T., and Good, S.S. (1994a). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8302–8306.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T., and Good, S.S. (1994b). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8302–8306.
- Hui, K.M., Ang, P.T., Huang, L., and Tay, S.K. (1997). Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther.* *4*, 783–790.
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., and Takashi, T.A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* *6*, 543–553.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816–821.
- Johnson, E.F., and Stout, C.D. (2013). Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome p450s. *J. Biol. Chem.* *288*, 17082–17090.
- Jongkamonwiwat, N., and Noisa, P. (2013). Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders. *BioMed Res. Int.* *2013*, 656531.
- Ju, D.W., Wang, B.M., and Cao, X. (1998). Adenovirus-mediated combined suicide gene and interleukin-2 gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *124*, 683–689.
- June, C.H., Maus, M.V., Plesa, G., Johnson, L.A., Zhao, Y., Levine, B.L., Grupp, S.A., and Porter, D.L. (2014). Engineered T cells for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *63*, 969–975.
- Kakinoki, K., Nakamoto, Y., Kagaya, T., Tsuchiyama, T., Sakai, Y., Nakahama, T., Mukaida, N., and Kaneko, S. (2010). Prevention of intrahepatic metastasis of liver cancer by suicide gene

therapy and chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* *12*, 1002–1013.

Kaliberova, L.N., Della Manna, D.L., Krendelchtchikova, V., Black, M.E., Buchsbaum, D.J., and Kaliberov, S.A. (2008). Molecular chemotherapy of pancreatic cancer using novel mutant bacterial cytosine deaminase gene. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2845–2854.

Kan, O., Kingsman, S., and Naylor, S. (2002). Cytochrome P450-based cancer gene therapy: current status. *Expert Opin. Biol. Ther.* *2*, 857–868.

Kano, A., Moriyama, K., Yamano, T., Nakamura, I., Shimada, N., and Maruyama, A. (2011). Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *149*, 2–7.

Karjoo, Z., Chen, X., and Hatefi, A. (2016). Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *99*, 113–128.

Karp, J.M., and Leng Teo, G.S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* *4*, 206–216.

Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M., Kassis, I., Bulte, J.W.M., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O., et al. (2010). Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* *67*, 1187–1194.

Kasinskas, R.W., and Forbes, N.S. (2007). Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res.* *67*, 3201–3209.

Kay, M.A., Glorioso, J.C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* *7*, 33–40.

Kenyon, J.C., and Lever, A.M.L. (2011). The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses* *3*, 2192–2213.

Kepp, O., Galluzzi, L., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Michaud, M., Sukkurwala, A.Q., Menger, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2011). Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* *30*, 61–69.

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 Rev.* *24*, 311–318.

Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., Apetoh, L., Aranda, F., Barnaba, V., Bloy, N., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* *3*, e955691.

Khammari, A., Nguyen, J.-M., Saint-Jean, M., Knol, A.-C., Pandolfino, M.-C., Quereux, G., Brocard, A., Peuvrel, L., Saiagh, S., Bataille, V., et al. (2015). Adoptive T cell therapy combined with intralesional administrations of TG1042 (adenovirus expressing interferon- γ) in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 64, 805–815.

Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., and Marini, F.C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2614–2623.

Kim, J.W., and Gulley, J.L. (2012). Poxviral vectors for cancer immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 463–478.

Kim, N., and Cho, S.-G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* 28, 387–402.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.

Klatzmann, D. (1996). Gene therapy for metastatic malignant melanoma: evaluation of tolerance to intratumoral injection of cells producing recombinant retroviruses carrying the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene, to be followed by ganciclovir administration. *Hum. Gene Ther.* 7, 255–267.

Klatzmann, D., Philippon, J., Valery, C.A., Bensimon, G., and Salzman, J.-L. (1996). Gene Therapy for Glioblastoma in Adult Patients: Safety and Efficacy Evaluation of an *In Situ* Injection of Recombinant Retroviruses Producing Cells Carrying the Thymidine Kinase Gene of the Herpes Simplex Type 1 Virus, to be Followed with the Administration of Ganciclovir. Laboratoire Immunologie B, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris Cedex, France. *Hum. Gene Ther.* 7, 109–126.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.

Kohles, N., Nagel, D., Jüngst, D., Stieber, P., and Holdenrieder, S. (2012). Predictive value of immunogenic cell death biomarkers HMGB-1, sRAGE, and DNase in liver cancer patients receiving transarterial chemoembolization therapy. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 33, 2401–2409.

Köhne, C.-H., Thuss-Patience, P., Friedrich, M., Daniel, P., Kretzschmar, A., Benter, T., Bauer, B., Dietz, R., and Dörken, B. (1998). Raltitrexed (Tomudex): an alternative drug for patients with colorectal cancer and 5-fluorouracil associated cardiotoxicity. *Br. J. Cancer* 77, 973–977.

Kolf, C.M., Cho, E., and Tuan, R.S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 9, 204.

Koppula, P.R., Chelluri, L.K., Poliseti, N., and Vemuganti, G.K. (2009). Histocompatibility testing of cultivated human bone marrow stromal cells - a promising step towards pre-clinical screening for allogeneic stem cell therapy. *Cell. Immunol.* *259*, 61–65.

Korhonen, L.E., Turpeinen, M., Rahnasto, M., Wittekindt, C., Poso, A., Pelkonen, O., Raunio, H., and Juvonen, R.O. (2007). New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *Br. J. Pharmacol.* *150*, 932–942.

Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* *103*, 1345–1352.

Kreiss, P., and Scherman, D. (1999). Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique. *Médecine/Sciences* *15*, 669.

Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2015). Immunotherapy of hematological cancers: PD-1 blockade for the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Oncoimmunology* *4*, e1008853.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 51–72.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., et al. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* *114*, 1141–1149.

Krysko, D.V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 860–875.

Kuriyama, N., Kuriyama, H., Julin, C.M., Lamborn, K.R., and Israel, M.A. (2001). Protease pretreatment increases the efficacy of adenovirus-mediated gene therapy for the treatment of an experimental glioblastoma model. *Cancer Res.* *61*, 1805–1809.

Kuriyama, S., Kikukawa, M., Masui, K., Okuda, H., Nakatani, T., Sakamoto, T., Yoshiji, H., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C.A., et al. (1999). Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int. J. Cancer* *81*, 592–597.

Kuriyama, S., Tsujinoue, H., and Yoshiji, H. (2004a). Immune response to suicide gene therapy. *Methods Mol. Med.* *90*, 353–369.

Kuriyama, S., Tsujinoue, H., and Yoshiji, H. (2004b). Immune response to suicide gene therapy. *Methods Mol. Med.* *90*, 353–369.

Kuzmina, L.A., Petinati, N.A., Parovichnikova, E.N., Lubimova, L.S., Gribanova, E.O., Gaponova, T.V., Shipounova, I.N., Zhironkina, O.A., Bigildeev, A.E., Svinareva, D.A., et al.

(2012). Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* *2012*, 968213.

Laemmli, U.K. (1975). Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 4288–4292.

Lafaro, K., Grandhi, M.S., Herman, J.M., and Pawlik, T.M. (2016). The importance of surgical margins in primary malignancies of the liver. *J. Surg. Oncol.* *113*, 296–303.

Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M.L., Fackenthal, J.D., Rogan, P.K., Ring, B., Wrighton, S.A., et al. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *307*, 906–922.

Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nüssler, A.K., Neuhaus, P., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2001). Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* *11*, 399–415.

Langford, G., Dayan, A., Yla-Herttuala, S., and Eckland, D. (2009). A preclinical assessment of the safety and biodistribution of an adenoviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene (Cerepro) after intracerebral administration. *J. Gene Med.* *11*, 468–476.

Lavieri, R., Piccioli, P., Carta, S., Delfino, L., Castellani, P., and Rubartelli, A. (2014). TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5373–5381.

Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., et al. (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *11*, 389–398.

Le Blanc, K., and Ringdén, O. (2005). Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *11*, 321–334.

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* *31*, 890–896.

Lee, K.-H., Liapi, E., Buijs, M., Vossen, J., Hong, K., Georgiades, C., and Geschwind, J.-F.H. (2009). Considerations for implantation site of VX2 carcinoma into rabbit liver. *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR* *20*, 113–117.

Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., Mauchline, M.L., Giaccia, A.J., Minton, N.P., and Brown, J.M. (1997). Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Ther.* *4*, 791–796.

- Lewis, D.F.V., Lake, B.G., and Dickins, M. (2004). Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism. *Drug Metabol. Drug Interact.* *20*, 111–142.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* *203*, 2271–2279.
- Liao, G., Nayak, S., Regueiro, J.R., Berger, S.B., Detre, C., Romero, X., de Waal Malefyt, R., Chatila, T.A., Herzog, R.W., and Terhorst, C. (2010). GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.* *22*, 259–270.
- Liapi, E., and Geschwind, J.-F.H. (2007). Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 978–986.
- Lin, I.Y.C., Van, T.T.H., and Smooker, P.M. (2015). Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines* *3*, 940–972.
- Liu, R., Zhu, Y., Zhou, L., Zhao, P., Li, H., Zhu, L., Han, H., Lin, H., Kang, L., Wu, J., et al. (2012). Adenovirus-mediated delivery of interferon- γ gene inhibits the growth of nasopharyngeal carcinoma. *J. Transl. Med.* *10*, 256.
- Liu, Z.-J., Zhuge, Y., and Velazquez, O.C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* *106*, 984–991.
- Loeffler, M., Krüger, J.A., and Reisfeld, R.A. (2005). Immunostimulatory effects of low-dose cyclophosphamide are controlled by inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res.* *65*, 5027–5030.
- Lussier, D.M., Johnson, J.L., Hingorani, P., and Blattman, J.N. (2015). Combination immunotherapy with α -CTLA-4 and α -PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma. *J. Immunother. Cancer* *3*, 21.
- Lutsiak, M.E.C., Semnani, R.T., De Pascalis, R., Kashmiri, S.V.S., Schlom, J., and Sabzevari, H. (2005a). Inhibition of CD4⁽⁺⁾25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* *105*, 2862–2868.
- Lutsiak, M.E.C., Semnani, R.T., De Pascalis, R., Kashmiri, S.V.S., Schlom, J., and Sabzevari, H. (2005b). Inhibition of CD4⁽⁺⁾25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* *105*, 2862–2868.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *114*, 100–109.
- Mader, E.K., Butler, G., Dowdy, S.C., Mariani, A., Knutson, K.L., Federspiel, M.J., Russell, S.J., Galanis, E., Dietz, A.B., and Peng, K.-W. (2013). Optimizing patient derived mesenchymal stem cells as virus carriers for a Phase I clinical trial in ovarian cancer. *J. Transl. Med.* *11*, 20.

- Madondo, M.T., Quinn, M., and Plebanski, M. (2016a). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* 42, 3–9.
- Madondo, M.T., Quinn, M., and Plebanski, M. (2016b). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* 42, 3–9.
- Madondo, M.T., Quinn, M., and Plebanski, M. (2016c). Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* 42, 3–9.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.
- Mahoney, K.M., Rennert, P.D., and Freeman, G.J. (2015). Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 561–584.
- Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E., and Koç, O.N. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 33, 597–604.
- Mali, P., Esvelt, K.M., and Church, G.M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* 10, 957–963.
- Mamalis, A., Garcha, M., and Jagdeo, J. (2014). Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 511–519.
- 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. *Ann. Pharm. Fr.* 69, 62–69.
- Martin, H., Sarsat, J.-P., de Waziers, I., Housset, C., Balladur, P., Beaune, P., Albaladejo, V., and Lerche-Langrand, C. (2003). Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultured human liver slices. *Pharm. Res.* 20, 557–568.
- Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Séror, C., Métivier, D., Perfettini, J.-L., Zitvogel, L., et al. (2009). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3723–3728.
- Martuza, R.L. (1997). Act locally, think globally. *Nat. Med.* 3, 1323.
- Matar, P., Rozados, V.R., González, A.D., Dlugovitzky, D.G., Bonfil, R.D., and Scharovsky, O.G. (2000). Mechanism of antimetastatic immunopotentiality by low-dose cyclophosphamide. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 36, 1060–1066.
- Matar, P., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I., and Scharovsky, G.O. (2002). Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 50, 588–596.
- Matzinger, P. (2002a). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305.

- Matzinger, P. (2002b). An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961, 341–342.
- Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1964). PROLIFERATION OF HEMOPOIETIC COLONY-FORMING CELLS TRANSPLANTED INTO IRRADIATED MICE. *Radiat. Res.* 22, 383–397.
- Mei, S., Theys, J., Landuyt, W., Anne, J., and Lambin, P. (2002). Optimization of tumor-targeted gene delivery by engineered attenuated *Salmonella typhimurium*. *Anticancer Res.* 22, 3261–3266.
- Melis, M.H.M., Simpson, K.L., Dovedi, S.J., Welman, A., MacFarlane, M., Dive, C., Honeychurch, J., and Illidge, T.M. (2013). Sustained tumour eradication after induced caspase-3 activation and synchronous tumour apoptosis requires an intact host immune response. *Cell Death Differ.* 20, 765–773.
- 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. *Neurosci. Lett.* 527, 90–99.
- Mengesha, A., Wei, J.Z., Zhou, S.-F., and Wei, M.Q. (2010). Clostridial spores to treat solid tumours - potential for a new therapeutic modality. *Curr. Gene Ther.* 10, 15–26.
- Meregalli, M., A, F., and Y, T. (2011). Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir. *J. Stem Cell Res. Ther.* 1.
- Mesnil, M., and Yamasaki, H. (2000). Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 60, 3989–3999.
- Miller, C.H.T., Maher, S.G., and Young, H.A. (2009). Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1182, 69–79.
- Miller, C.R., Williams, C.R., Buchsbaum, D.J., and Gillespie, G.Y. (2002). Intratumoral 5-fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas. *Cancer Res.* 62, 773–780.
- Mintzer, M.A., and Simanek, E.E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* 109, 259–302.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 27, 743–745.
- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debré, P., Piette, J.-C., and Gorochoy, G. (2005). Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 8392–8400.

Moolten, F.L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* *46*, 5276–5281.

Mosconi, A.M., Crinò, L., and Tonato, M. (1997). Combination therapy with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990 33 Suppl 1*, S14-17.

van der Most, R.G., Currie, A.J., Mahendran, S., Prosser, A., Darabi, A., Robinson, B.W.S., Nowak, A.K., and Lake, R.A. (2009a). Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 58*, 1219–1228.

van der Most, R.G., Currie, A.J., Mahendran, S., Prosser, A., Darabi, A., Robinson, B.W.S., Nowak, A.K., and Lake, R.A. (2009b). Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 58*, 1219–1228.

Mueller, G.C., and Miller, J.A. (1948). The metabolism of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* *176*, 535–544.

Munn, D.H. (2009). Th17 cells in ovarian cancer. *Blood* *114*, 1134–1135.

Nakada, D., Levi, B.P., and Morrison, S.J. (2011). Integrating Physiological Regulation with Stem Cell and Tissue Homeostasis. *Neuron* *70*, 703–718.

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. *Pharmacogenet. Genomics* *17*, 431–445.

Nakamura, T., Sasaki, T., Fujimori, M., Yazawa, K., Kano, Y., Amano, J., and Taniguchi, S. 'ichiro (2002). Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *66*, 2362–2366.

Negri, D.R., Michelini, Z., Bona, R., Blasi, M., Filati, P., Leone, P., Rossi, A., Franco, M., and Cara, A. (2011). Integrase-defective lentiviral-vector-based vaccine: a new vector for induction of T cell immunity. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 739–750.

Nelson, D.R. (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ *320*, 1–10.

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., and Gotoh, O. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* *12*, 1–51.

Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M.G., Maltais, L.J., Wain, H.M., and Nebert, D.W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* *14*, 1–18.

Nemunaitis, J., Cunningham, C., Senzer, N., Kuhn, J., Cramm, J., Litz, C., Cavagnolo, R., Cahill, A., Clairmont, C., and Sznol, M. (2003a). Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* *10*, 737–744.

Nemunaitis, J., Cunningham, C., Senzer, N., Kuhn, J., Cramm, J., Litz, C., Cavagnolo, R., Cahill, A., Clairmont, C., and Sznol, M. (2003b). Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* *10*, 737–744.

Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S., Hawrylowicz, C.M., Oostra, B.A., Williamson, R., and Levin, M. (1996). A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1941–1949.

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. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1122–1133.

Nicholas, T.W., Read, S.B., Burrows, F.J., and Kruse, C.A. (2003). Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol. Histopathol.* *18*, 495–507.

Nicolini, A., Mancini, P., Ferrari, P., Anselmi, L., Tartarelli, G., Bonazzi, V., Carpi, A., and Giardino, R. (2004). Oral low-dose cyclophosphamide in metastatic hormone refractory prostate cancer (MHRPC). *Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacothérapie* *58*, 447–450.

Niess, H., Bao, Q., Conrad, C., Zischek, C., Notohamiprodjo, M., Schwab, F., Schwarz, B., Huss, R., Jauch, K.-W., Nelson, P.J., et al. (2011). Selective targeting of genetically engineered mesenchymal stem cells to tumor stroma microenvironments using tissue-specific suicide gene expression suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* *254*, 767–774–775.

Niess, H., von Einem, J.C., Thomas, M.N., Michl, M., Angele, M.K., Huss, R., Günther, C., Nelson, P.J., Bruns, C.J., and Heinemann, V. (2015). Treatment of advanced gastrointestinal tumors with genetically modified autologous mesenchymal stromal cells (TREAT-ME1): study protocol of a phase I/II clinical trial. *BMC Cancer* *15*.

Noisa, P., Lund, C., Kanduri, K., Lund, R., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Lundin, K., Chokechuwattanalert, H., Otonkoski, T., Tuuri, T., et al. (2014). Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* *127*, 2083–2094.

North, R.J. (1982). Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J. Exp. Med.* *155*, 1063–1074.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007a). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* *13*, 54–61.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007b). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* *13*, 54–61.

Obeid, M., Panaretakis, T., Tesniere, A., Joza, N., Tufi, R., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007c). Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from “silent” to immunogenic. *Cancer Res.* *67*, 7941–7944.

Obeid, M., Tesniere, A., Panaretakis, T., Tufi, R., Joza, N., van Endert, P., Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Chaput, N., Flament, C., et al. (2007d). Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunol. Rev.* *220*, 22–34.

Oda, Y., Hamaoka, N., Hiroi, T., Imaoka, S., Hase, I., Tanaka, K., Funae, Y., Ishizaki, T., and Asada, A. (2001). Involvement of human liver cytochrome P4502B6 in the metabolism of propofol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *51*, 281–285.

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461–472.

Olins, D.E., Olins, A.L., and Von Hippel, P.H. (1967). Model nucleoprotein complexes: studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA. *J. Mol. Biol.* *24*, 157–176.

Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2573–2582.

Omura, T., and Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* *237*, 1375–1376.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* *59*, 3128–3133.

OpenStax (2013). Adaptive Immune Response.

Osten, P., Grinevich, V., and Cetin, A. (2007). Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb. Exp. Pharmacol.* *177–202*.

Ostertag, D., Amundson, K.K., Lopez Espinoza, F., Martin, B., Buckley, T., Galvão da Silva, A.P., Lin, A.H., Valenta, D.T., Perez, O.D., Ibañez, C.E., et al. (2012). Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector. *Neuro-Oncol.* *14*, 145–159.

- Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 581–593.
- Palmer, D.H., Mautner, V., Mirza, D., Oliff, S., Gerritsen, W., van der Sijp, J.R.M., 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. *J. Clin. Oncol.* 22, 1546–1552.
- Pan, J.G., Zhou, X., Luo, R., and Han, R.F. (2012). The adeno-associated virus-mediated HSV-TK/GCV suicide system: a potential strategy for the treatment of bladder carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 29, 1938–1947.
- Panaretakis, T., Joza, N., Modjtahedi, N., Tesniere, A., Vitale, I., Durchschlag, M., Fimia, G.M., Kepp, O., Piacentini, M., Froehlich, K.-U., et al. (2008). The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1499–1509.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.-C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., et al. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 28, 578–590.
- 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 Int.* 95, 1336–1343.
- Paoloni, M., and Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat. Rev. Cancer* 8, 147–156.
- Papanastasopoulos, P., and Stebbing, J. (2014). Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. *Anticancer Res.* 34, 1531–1535.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet* 357, 1777–1789.
- 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]. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1292–1299.
- Patterson, A., and Harris, A.L. (1999). Molecular chemotherapy for breast cancer. *Drugs Aging* 14, 75–90.
- Pavlovic, J., Nawrath, M., Tu, R., Heinicke, T., and Moelling, K. (1996). Anti-tumor immunity is involved in the thymidine kinase-mediated killing of tumors induced by activated K-ras(G12V). *Gene Ther.* 3, 635–643.
- Pawelek, J.M., Low, K.B., and Bermudes, D. (1997). Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* 57, 4537–4544.

- Payer, B., Lee, J.T., and Namekawa, S.H. (2011). X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum. Genet.* *130*, 265–280.
- Peltzer, J., Lund, K., and Lataillade, J.-J. (2015). [Paracrine properties of Mesenchymal Stromal Cells]. *Bull. Académie Natl. Médecine* *199*, 501–514.
- Penn, I. (2000). Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf.* *23*, 101–113.
- Peplinski, G.R., Tsung, A.K., Casey, M.J., Meko, J.B., Fredrickson, T.N., Buller, R.M., and Norton, J.A. (1996). In vivo murine tumor gene delivery and expression by systemic recombinant vaccinia virus encoding interleukin-1beta. *Cancer J. Sci. Am.* *2*, 21–27.
- Pera, M.F., and Trounson, A.O. (2004). Human embryonic stem cells: prospects for development. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 5515–5525.
- Pera, M.F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E.G., Ward-van Oostwaard, D., and Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell Sci.* *117*, 1269–1280.
- Phinney, D.G., Kopen, G., Isaacson, R.L., and Prockop, D.J. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell. Biochem.* *72*, 570–585.
- Pierrefite-Carle, V., Baqué, P., Gavelli, A., Brossette, N., Benchimol, D., Bourgeon, A., Saint Paul, M.C., Staccini, P., and Rossi, B. (2002). Subcutaneous or intrahepatic injection of suicide gene modified tumour cells induces a systemic antitumour response in a metastatic model of colon carcinoma in rats. *Gut* *50*, 387–391.
- Pinnamaneni, N., and Funderburgh, J.L. (2012). Concise Review: Stem Cells in the Corneal Stroma. *STEM CELLS* *30*, 1059–1063.
- Pistello, M., Vannucci, L., Ravani, A., Bonci, F., Chiuppesi, F., del Santo, B., Freer, G., and Bendinelli, M. (2007). Streamlined design of a self-inactivating feline immunodeficiency virus vector for transducing ex vivo dendritic cells and T lymphocytes. *Genet. Vaccines Ther.* *5*, 8.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143–147.
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y.Z., Heinemann, V., Grunewald, R., and Gandhi, V. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin. Oncol.* *22*, 3–10.
- Poeschla, E.M., Wong-Staal, F., and Looney, D.J. (1998). Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* *4*, 354–357.
- Portsmouth, D., Hlavaty, J., and Renner, M. (2007a). Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* *28*, 4–41.

- Portsmouth, D., Hlavaty, J., and Renner, M. (2007b). Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 28, 4–41.
- Pouwels, S.D., Heijink, I.H., ten Hacken, N.H.T., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Nawijn, M.C., and van Oosterhout, A.J.M. (2014). DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol.* 7, 215–226.
- Prajumwongs, P., Weeranantanapan, O., Jaroonwitchawan, T., and Noisa, P. (2016). Human Embryonic Stem Cells: A Model for the Study of Neural Development and Neurological Diseases. *Stem Cells Int.* 2016, 2958210.
- 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. Ger.* 89, 1113–1124.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74.
- Prockop, D.J. (2007). “Stemness” does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 241–243.
- Prosser, G.A., Copp, J.N., Syddall, S.P., Williams, E.M., Smaill, J.B., Wilson, W.R., Patterson, A.V., and Ackerley, D.F. (2010). Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochem. Pharmacol.* 79, 678–687.
- Prosser, G.A., Copp, J.N., Mowday, A.M., Guise, C.P., Syddall, S.P., Williams, E.M., Horvat, C.N., Swe, P.M., Ashoorzadeh, A., Denny, W.A., et al. (2013). Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bio-reductive prodrugs CB1954 and PR-104A. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1091–1103.
- van Putten, E.H., Dirven, C.M., van den Bent, M.J., and Lamfers, M.L. (2010). Sitimagene ceradenovec: a gene-based drug for the treatment of operable high-grade glioma. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 1691–1710.
- Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat. Med.* 4, 627–630.
- Ram, Z., Culver, K.W., Oshiro, E.M., Viola, J.J., DeVroom, H.L., Otto, E., Long, Z., Chiang, Y., McGarrity, G.J., Muul, L.M., et al. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* 3, 1354–1361.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308.
- Rendic, S., and Carlo, F.J.D. (1997). Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 29, 413–580.

- Rendic, S., and Guengerich, F.P. (2015). Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* *28*, 38–42.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1134–1140.
- Richard, C., Duivenvoorden, W., Bourbeau, D., Massie, B., Roa, W., Yau, J., and Th'ng, J. (2007). Sensitivity of 5-fluorouracil-resistant cancer cells to adenovirus suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* *14*, 57–65.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G.-R., Kaps, C., and Sittlinger, M. (2007). Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell. Biochem.* *101*, 135–146.
- Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* *3*, e403.
- Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* *481*, 295–305.
- Rogers, I., and Casper, R.F. (2004). Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *18*, 893–908.
- Rostami-Hodjegan, A., and Tucker, G.T. (2007). Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 140–148.
- Roux, S., Apetoh, L., Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Puig, P.-E., Lauvau, G., Zitvogel, L., Martin, F., Chauffert, B., et al. (2008). CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J. Clin. Invest.* *118*, 3751–3761.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazson, M., Dumitriu, I.E., Müller, S., Iannaccone, M., Traversari, C., et al. (2004). HMGB-1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* *5*, 825–830.
- Rudin, D., Li, L., Niu, N., R. Kalari, K., and A. Gilbert, J. (2011). Gemcitabine Cytotoxicity: Interaction of Efflux and Deamination. *J. Drug Metab. Toxicol.* *2*.
- Ruiz van Haperen, V.W., Veerman, G., Vermorken, J.B., and Peters, G.J. (1993). 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 762–766.
- Russ, B.E., Prier, J.E., Rao, S., and Turner, S.J. (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front. Genet.* *4*.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* *182*, 18–32.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* *133*, 775–787.
- Sakuma, T., Barry, M.A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* *443*, 603–618.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB-1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.
- Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L.M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., et al. (2012). HMGB-1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* *209*, 551–563.
- Schwarz, D., Pirwitz, 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *171*, 175–181.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13196–13201.
- Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z., and Abraham, E. (2008). HMGB-1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2531–2537.
- Shanafelt, T.D., Lin, T., Geyer, S.M., Zent, C.S., Leung, N., Kabat, B., Bowen, D., Grever, M.R., Byrd, J.C., and Kay, N.E. (2007). Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab regimen in older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* *109*, 2291–2298.
- Shen, Y., and Nemunaitis, J. (2005). Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *11*, 180–195.
- Shi, S., and Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *18*, 696–704.
- Shi, D., Hu, W., Li, L., Chen, G., Wei, D., and Gu, P. (2009). Pharmacokinetics and the bystander effect in CD::UPRT/5-FC bi-gene therapy of glioma. *Chin. Med. J. (Engl.)* *122*, 1267–1272.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 5211–5218.

- 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. *Arch. Biochem. Biophys.* *235*, 86–96.
- Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Takeuchi, O., Akira, S., and Nakanishi, Y. (2004). Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 2039–2047.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., and Zitvogel, L. (2011a). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin. Immunopathol.* *33*, 369–383.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., and Zitvogel, L. (2011b). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin. Immunopathol.* *33*, 369–383.
- Smith, R.H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* *15*, 817–822.
- 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. *Curr. Drug Metab.* *14*, 1059–1069.
- Sonnemann, J., Gressmann, S., Becker, S., Wittig, S., Schmutte, M., and Beck, J.F. (2010). The histone deacetylase inhibitor vorinostat induces calreticulin exposure in childhood brain tumour cells in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *66*, 611–616.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., and Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* *15*, 730–738.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* *2*, 230–240.
- Staunstrup, N.H., and Mikkelsen, J.G. (2011). Integrase-defective lentiviral vectors--a stage for nonviral integration machineries. *Curr. Gene Ther.* *11*, 350–362.
- Steer, S.A., Scarim, A.L., Chambers, K.T., and Corbett, J.A. (2006). Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB-1. *PLoS Med.* *3*, e17.
- Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* *156*, 25–37.
- Steitz, J., Brück, J., Lenz, J., Knop, J., and Tüting, T. (2001). Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res.* *61*, 8643–8646.

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. *Hum. Gene Ther.* *9*, 1083–1092.

Stewart, K., Monk, P., Walsh, S., Jefferiss, C.M., Letchford, J., and Beresford, J.N. (2003). STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* *313*, 281–290.

Stoetzer, O.J., Wittwer, C., Lehner, J., Fahmueller, Y.N., Kohles, N., Fersching, D.M.I., Leszinski, G., Roessner, J., and Holdenrieder, S. (2012). Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12 Suppl 1*, S217-224.

Stoetzer, O.J., Fersching, D.M.I., Salat, C., Steinkohl, O., Gabka, C.J., Hamann, U., Braun, M., Feller, A.-M., Heinemann, V., Siegele, B., et al. (2013). Circulating immunogenic cell death biomarkers HMGB-1 and RAGE in breast cancer patients during neoadjuvant chemotherapy. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *34*, 81–90.

Stribbling, S.M., Friedlos, F., Martin, J., Davies, L., Spooner, R.A., Marais, R., and Springer, C.J. (2000). Regressions of established breast carcinoma xenografts by carboxypeptidase G2 suicide gene therapy and the prodrug CMDA are due to a bystander effect. *Hum. Gene Ther.* *11*, 285–292.

Studený, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J., and Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* *62*, 3603–3608.

Studený, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B.N., Champlin, R.E., and Andreeff, M. (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 1593–1603.

Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P., and Negishi, M. (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* *274*, 6043–6046.

Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., et al. (2010). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *62*, 2467–2475.

Swain, S.L., Bradley, L.M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A.D., Duncan, D.D., Hedrick, S.M., Dutton, R.W., and Huston, G. (1991). Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol. Rev.* *123*, 115–144.

Tabuchi, Y., Nakamura, T., and Saitoh, Y. (1991). Liver metastases induced by implantation of VX2 cancer into the gastrointestinal tract. *J. Surg. Res.* *50*, 216–222.

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007b). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tang, Y., Cummins, J., Huard, J., and Wang, B. (2010). AAV-directed muscular dystrophy gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10, 395–408.
- Telenti, A., and Zanger, U.M. (2008). Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 227–256.
- Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 504–511.
- Tester, W., and Mora, J. (2001). Innovative treatments for non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 1021–1032.
- Theys, J., Pennington, O., Dubois, L., Anlezark, G., Vaughan, T., Mengesha, A., Landuyt, W., Anné, J., Burke, P.J., Dürre, P., et al. (2006). Repeated cycles of Clostridium-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo. *Br. J. Cancer* 95, 1212–1219.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4, 346–358.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A.E., and Thorburn, A. (2009a). Autophagy regulates selective HMGB-1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16, 175–183.
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A.E., and Thorburn, A. (2009b). Autophagy regulates selective HMGB-1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16, 175–183.
- Tierny, D., Serres, F., Segaula, Z., Bemelmans, I., Bouchaert, E., Pétaïn, A., Brel, V., Couffin, S., Marchal, T., Nguyen, L., et al. (2015). Phase I Clinical Pharmacology Study of F14512, a New Polyamine-Vectorized Anticancer Drug, in Naturally Occurring Canine Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 5314–5323.

- Töpfer, K., Kempe, S., Müller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M., Schackert, G., and Temme, A. (2011). Tumor Evasion from T Cell Surveillance. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 1–19.
- Totah, R.A., Sheffels, P., Roberts, T., Whittington, D., Thummel, K., and Kharasch, E.D. (2008). Role of CYP2B6 in stereoselective human methadone metabolism. *Anesthesiology* *108*, 363–374.
- Touati, W., Tran, T., Seguin, J., Diry, M., Flinois, J.-P., Baillou, C., Lescaille, G., Andre, F., Tartour, E., Lemoine, F.M., et al. (2014a). A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response. *Curr. Gene Ther.* *14*, 236–246.
- Touati, W., Tran, T., Seguin, J., Diry, M., Flinois, J.-P., Baillou, C., Lescaille, G., Andre, F., Tartour, E., Lemoine, F.M., et al. (2014b). A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response. *Curr. Gene Ther.* *14*, 236–246.
- Touraine, R.L., Vahanian, N., Ramsey, W.J., and Blaese, R.M. (1998). Enhancement of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir bystander effect and its antitumor efficacy in vivo by pharmacologic manipulation of gap junctions. *Hum. Gene Ther.* *9*, 2385–2391.
- Trivedi, and Vanikar (2013). Mesenchymal Stem Cells And Solid Organ Transplantation. *CellR4* *2*.
- Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G., and Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* *9*, 52.
- Tsai, M.-S., Lee, J.-L., Chang, Y.-J., and Hwang, S.-M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *19*, 1450–1456.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* *75*, 389–397.
- Turpeinen, M., and Zanger, U.M. (2012). Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabol. Drug Interact.* *27*, 185–197.
- Turpeinen, M., Raunio, H., and Pelkonen, O. (2006). The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr. Drug Metab.* *7*, 705–714.
- 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 Ther.* *12*, 497–508.

- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* *172*, 146–155.
- Tzeng, C.-W.D., and Aloia, T.A. (2013). Colorectal liver metastases. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* *17*, 195-201 201–202.
- Uttenenthal, B.J., Chua, I., Morris, E.C., and Stauss, H.J. (2012). Challenges in T cell receptor gene therapy. *J. Gene Med.* *14*, 386–399.
- Valori, C.F., Ning, K., Wyles, M., and Azzouz, M. (2008). Development and applications of non-HIV-based lentiviral vectors in neurological disorders. *Curr. Gene Ther.* *8*, 406–418.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013a). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* *36*, 1–22.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013b). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* *36*, 1–22.
- Vernejoul, F., Ghénassia, 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. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *14*, 758–767.
- Viaud, S., Flament, C., Zoubir, M., Pautier, P., LeCesne, A., Ribrag, V., Soria, J.-C., Marty, V., Vielh, P., Robert, C., et al. (2011a). Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* *71*, 661–665.
- Viaud, S., Flament, C., Zoubir, M., Pautier, P., LeCesne, A., Ribrag, V., Soria, J.-C., Marty, V., Vielh, P., Robert, C., et al. (2011b). Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* *71*, 661–665.
- 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. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *10*, 199–206.
- Wang, Y., Canine, B.F., and Hatefi, A. (2011). HSV-TK/GCV cancer suicide gene therapy by a designed recombinant multifunctional vector. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *7*, 193–200.
- Ward, B.A., Gorski, J.C., Jones, D.R., Hall, S.D., Flockhart, D.A., and Desta, Z. (2003). The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *306*, 287–300.
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O’Shea, J.J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *282*, 34605–34610.

- Weiss, E.-M., Frey, B., Rödel, F., Herrmann, M., Schlücker, E., Voll, R.E., Fietkau, R., and Gaipl, U.S. (2010). Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1209*, 109–117.
- Westin, J.R., Chu, F., Zhang, M., Fayad, L.E., Kwak, L.W., Fowler, N., Romaguera, J., Hagemester, F., Fanale, M., Samaniego, F., et al. (2014). Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 69–77.
- Whitman, E.D., Tsung, K., Paxson, J., and Norton, J.A. (1994). In vitro and in vivo kinetics of recombinant vaccinia virus cancer-gene therapy. *Surgery* *116*, 183–188.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., and Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* *3*, 362–372.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 171–192.
- Williams, E.M., Little, R.F., Mowday, A.M., Rich, M.H., Chan-Hyams, J.V.E., Copp, J.N., Smaill, J.B., Patterson, A.V., and Ackerley, D.F. (2015). Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem. J.* *471*, 131–153.
- Williams, J.A., Hyland, R., Jones, B.C., Smith, D.A., Hurst, S., Goosen, T.C., Peterkin, V., Koup, J.R., and Ball, S.E. (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *32*, 1201–1208.
- Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* *11*, 7–13.
- Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstien, B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 606–612.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1309–1323.
- Woo, E.Y., Yeh, H., Chu, C.S., Schlienger, K., Carroll, R.G., Riley, J.L., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2002). Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4272–4276.
- Wu, X., and Burgess, S.M. (2004). Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *61*, 2588–2596.

- Wu, J., Xiao, X., Jia, H., Chen, J., Zhu, Y., Zhao, P., Lin, H., and Huang, W. (2009). Dynamic distribution and expression in vivo of the human interferon gamma gene delivered by adenoviral vector. *BMC Cancer* 9, 55.
- Xie, H., Griskevicius, L., Stähle, L., Hassan, Z., Yasar, U., Rane, A., Broberg, U., Kimby, E., and Hassan, M. (2006). Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 27, 54–61.
- 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. *Pharmacogenomics J.* 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 Ther.* 16, 723–730.
- Xu, Y., Malladi, P., Wagner, D.R., and Longaker, M.T. (2005). Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7, 300–305.
- Yakobson, B., Hrynko, T.A., Peak, M.J., and Winocour, E. (1989). Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J. Virol.* 63, 1023–1030.
- Yalkinoglu, A.O., Heilbronn, R., Bürkle, A., Schlehofer, J.R., and zur Hausen, H. (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* 48, 3123–3129.
- Yamasaki, H. (1991). Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 93, 191–197.
- Yamashita, M., and Emerman, M. (2006). Retroviral infection of non-dividing cells: old and new perspectives. *Virology* 344, 88–93.
- Yanagihara, Y., Kariya, S., Ohtani, M., Uchino, K., Aoyama, T., Yamamura, Y., and Iga, T. (2001). Involvement of CYP2B6 in n-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 29, 887–890.
- Yang, W., Chen, P.W., Li, H., Alizadeh, H., and Niederkorn, J.Y. (2008). PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2518–2525.
- Yengi, L.G., Xiang, Q., Pan, J., Scatina, J., Kao, J., Ball, S.E., Fruncillo, R., Ferron, G., and Roland Wolf, C. (2003). Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal. Biochem.* 316, 103–110.
- Young, S.D., Whissell, M., Noble, J.C.S., Cano, P.O., Lopez, P.G., and Germond, C.J. (2006). Phase II clinical trial results involving treatment with low-dose daily oral cyclophosphamide, weekly vinblastine, and rofecoxib in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 3092–3098.

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 Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *29*, 304–312.

Yu, W.-Y., Chuang, T.-F., Guichard, C., El-Garch, H., Tierny, D., Laio, A.T., Lin, C.-S., Chiou, K.-H., Tsai, C.-L., Liu, C.-H., et al. (2011). Chicken HSP70 DNA vaccine inhibits tumor growth in a canine cancer model. *Vaccine* *29*, 3489–3500.

Zanger, U.M., Klein, K., Saussele, T., Bliedernicht, J., Hofmann, M.H., and Schwab, M. (2007). Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* *8*, 743–759.

Zeh, H.J., and Bartlett, D.L. (2002). Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers. *Cancer Gene Ther.* *9*, 1001–1012.

Zhang, J., Kale, V., and Chen, M. (2015). Gene-directed enzyme prodrug therapy. *AAPS J.* *17*, 102–110.

Zhao, J., Cao, Y., Lei, Z., Yang, Z., Zhang, B., and Huang, B. (2010). Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res.* *70*, 4850–4858.

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.

Zischek, C., Niess, H., Ischenko, I., Conrad, C., Huss, R., Jauch, K.-W., Nelson, P.J., and Bruns, C. (2009). Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann. Surg.* *250*, 747–753.

Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* *140*, 798–804.

Zitvogel, L., Hannani, D., Aymeric, L., Kepp, O., Martins, I., and Kroemer, G. (2012). [Anti-tumoral immunization during cancer chemotherapy]. *Bull. Académie Natl. Médecine* *196*, 1075–1086.

Système HLA, présentation de l'antigène et réponse immunitaire. - ppt télécharger.

CD8+ T Cells | Bitesized Immunology.

Cancer Immunology: PD-1 and Beyond.

RESUME

Les chimiothérapies actuelles manquent encore souvent d'efficacité et présentent de nombreux effets secondaires délétères. De ce fait, de nouvelles stratégies émergent, avec parmi elles, la thérapie gène suicide qui consiste à transférer un gène qui va métaboliser une pro-drogue en métabolites toxiques dans la tumeur. Nous avons choisi cette approche avec un gène le CYP2B6 et une pro-drogue le cyclophosphamide. Ce gène-suicide a précédemment été optimisé : CYP2B6TM-RED, l'existence d'un effet "by-stander" démontré et une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales mise en évidence.

Le premier objectif de mon travail était d'améliorer le transfert du gène suicide au sein des tumeurs par l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Nous avons démontré l'efficacité de cette stratégie *in vitro* et *in vivo* sur des souris immunocompétentes et sur des lapins. Nous avons également évaluées deux voies d'administration, intra-tumorale et intra-artérielle. L'immunité anti-tumorale a été conservée avec ce système MSC-CYP2B6TM-RED + CPA.

Mon deuxième objectif était d'étudier l'implication du système immunitaire dans la réponse au traitement par notre stratégie gène suicide. Nous avons démontré que notre approche induisait aussi une mort immunogénique des cellules tumorales qui pourrait être à l'origine de la réponse immune observée lors des études *in vivo*.

Ainsi, notre thérapie gène suicide constituerait un traitement prometteur pour les tumeurs solides.

ABSTRACT

Current chemotherapies often lack efficiency and causes many side effects. Therefore new strategies emerge, among them the suicide-gene therapy. It consists in expressing a suicide-gene which will convert a pro-drug into cytotoxic metabolites in the tumor. We chosen Cyclophosphamide as pro-drug and CYP2B6 as gene. It has been previously optimized (CYP2B6TM-RED), and a "by-stander" effect and an immune response against tumor cells were present upon this treatment.

The first objective of my work was to improve the transfer of the suicide gene in tumors through the use of mesenchymal stem cells (MSCs).

The efficacy of this strategy was demonstrated *in vitro* and *in vivo* on immunocompetent mice and rabbits. We also evaluated different types of MSCs injection: intra-tumoral and intra-arterial. Anti-tumor immune response has also been observed with our MSC-CYP2B6TM-RED + CPA system.

My second objective was to investigate the involvement of the immune system in our suicide gene strategy. We have demonstrated that our suicide gene therapy also induced an immunogenic cell death towards tumor cells that could cause the immune response observed in vivo studies.

Thus, our suicide-gene therapy approach is a promising treatment for solid tumors to test in future clinical trials.