

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE-PHARMACIE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2013

Carcinome hépatocellulaire :
- Immunothérapie à l'aide d'un anticorps anti-CD137
- Potentiel tumorigène d'un virus adéno-associé recombinant

THESE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie-Médecine-Santé
Spécialité : Immuno-cancérologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Vanessa GAUTIER

Le 19 février 2013, devant le jury ci-dessous

Président	Dr Nathalie LABARRIERE
Rapporteurs	Dr Hélène GILGENKRANTZ Pr Gabriel PERLEMUTER
Examineur	Dr Nathalie LABARRIERE

Directeur de thèse Dr Sophie CONCHON, Chargé de recherche INSERM

Abréviations

AAF : acétylaminofluorène
AAV : virus adéno-associé
ADN : acide désoxyribonucléique
AFP : α -foetoprotéine
ARNm : acide ribonucléique messenger
BCG : bacille de Calmette et Guérin
CD : groupe de différenciation
CHC : carcinome hépatocellulaire
CIK : cellules tueuses induites par des cytokines
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
CPA : cellules présentatrices d'antigènes
CTL : lymphocytes T cytotoxiques
CTLA : antigène des lymphocytes T cytotoxiques
DC : cellules dendritiques
DEN : diéthylnitrosamine
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : facteur de stimulation des granulocytes et macrophages
HLA : antigènes des leucocytes humains
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
ITR : séquence terminale répétée inversée
LAK : cellules tueuses activées par des lymphokines
LAM-PCR : amplification linéaire médiée par PCR
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocyte T
MDSC : cellules myéloïdes suppressives
NK : cellules tueuses (natural killer)
NKT : cellules lymphocytaires tueuses
PBL : lymphocytes du sang périphérique
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
PCR : polymerase chain reaction
PD-1 : protéine de mort cellulaire programmée
RFA : ablation par radiofréquence
TACE : chimio-embolisation transartérielle
TCR : récepteur des lymphocytes T
TGF : facteur de croissance transformant
TLR : toll-like receptor
TNF : facteur de nécrose tumorale
Treg : lymphocyte T régulateur
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C

Liste des illustrations

Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents dans le monde (d'après (Ferlay J 2010))	8
Figure 2 : Incidence du cancer du foie dans le monde (taux par 100 000 hommes) (d'après (Ferlay J 2010))	9
Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer du foie dans le monde ajustées selon l'âge (d'après (Ferlay J 2010)).....	10
Figure 4 : Principales voies de signalisation oncogéniques activées lors d'un CHC (d'après (Yam et al. 2010))	18
Figure 5 : Principaux types cellulaires ayant un rôle dans les réponses innée et adaptative anti-tumorales (d'après (Borghaei et al. 2009)).....	27
Figure 6 : Espace sinusoïdal hépatique (d'après (van Golen et al. 2012)).....	30
Figure 7 : Signaux nécessaires à l'activation d'un lymphocyte T (d'après (Charles Janeway 2006))	36
Figure 8 : Transduction du signal du CD137 dans un lymphocyte T (d'après (Wang et al. 2009)).....	40
Figure 9 : Médiateurs cellulaires possibles de l'effet thérapeutique de l'anticorps anti-CD137 (d'après (Melero et al. 2008)).....	45
Figure 10 : Exemple du rôle paradoxal d'un anticorps anti-CD137 (d'après (Myers and Vella 2005))..	49
Figure 11 : Vecteurs utilisés en thérapie génique (d'après http://www.wiley.com/genmed/clinical) ...	64
Figure 12 : Entrée cellulaire et trafic d'un AAV recombinant (d'après (Schultz and Chamberlain 2008))	68
Figure 13 : Devenir du génome d'un AAV recombinant dans le noyau de la cellule hôte.....	69
Tableau 1 : Essais cliniques d'immunothérapie du CHC	33
Tableau 2 : Essais précliniques dans des modèles d'infections virale et bactérienne.....	46
Tableau 3 : Principaux essais précliniques d'immunothérapie anti-cancer utilisant la voie CD137/CD137L	52

Sommaire

Abréviations.....	1
Liste des illustrations.....	3
Préambule.....	6
Partie 1 : Le carcinome hépatocellulaire.....	7
A : Carcinogénèse et épidémiologie	7
1-Epidémiologie	8
2-Etiologie.....	10
2.1 : Virus de l'hépatite B.....	11
2.2 : Virus de l'hépatite C	11
2.3 : Alcool.....	12
2.4 : Aflatoxine B1.....	12
2.5 : Diabète, obésité, et syndrome métabolique	13
2.6 : Autres facteurs de risque.....	14
3-Développement d'un CHC	14
3.1 : Cirrhose et CHC : mécanismes moléculaires.....	15
3.2 : Cirrhose et CHC : médiateurs.....	16
B : Prise en charge du carcinome hépatocellulaire	19
1-Prévention et surveillance	20
2-Traitements curatifs.....	20
2.1 : Résection chirurgicale	20
2.2 : Transplantation	21
2.3 : Destruction percutanée.....	21
3-Traitements palliatifs	22
C : Modèles de CHC.....	23
D : Immunothérapie.....	26
1-Rationnel d'une immunothérapie pour un CHC	28
2-Système immunitaire hépatique	29
3-Immunothérapie du CHC	31
Partie 2 : Immunothérapie du carcinome hépatocellulaire à l'aide d'un anticorps anti-CD137.....	35
A : Expression du CD137 et de son ligand.....	36
1-Expression du CD137.....	37
2-Expression du CD137L.....	38
B : Voies de signalisation du CD137 et de son ligand.....	39
1-Signalisation du CD137	39
2-Signalisation inverse du CD137L.....	41
C : Fonction du CD137 ou du CD137L	41
1-Chez la souris.....	41
2-Chez l'homme	43

D : Thérapies utilisant la voie CD137/CD137L.....	44
1-Immunité antivirale et antibactérienne	45
2-Tolérance médiée par le CD137 et auto-immunité	47
3-Immunothérapie des cancers.....	50
3.1 : Anticorps monoclonaux anti-CD137.....	50
3.2 : Immunothérapies combinées avec un anti-CD137.....	53
3.3 : Immunothérapies anti-tumorales à l'aide d'un anti-CD137 dans le foie.....	53
3.4 : Autres traitements dérivés du CD137.....	54
3.5 : Essais cliniques.....	55
E : Résultats.....	57
F : Discussion	59
Partie 3 : AAV : facteur d'initiation du CHC ?.....	63
A : Généralités	63
B : Les virus adéno-associés (AAV)	66
1-Structure de l'AAV	66
2-Infection cellulaire par l'AAV.....	67
3-Intégration d'un AAV sauvage.....	69
4-Intégration d'un AAV recombinant	71
C : AAV et CHC.....	72
D : Résultats	75
E : Discussion.....	77
Conclusion.....	79
Références bibliographiques	81

Préambule

J'ai réalisé mon doctorat au sein du laboratoire U948 (biothérapies hépatiques) dirigé par le Dr Nicolas FERRY et plus particulièrement sous la direction du Dr Sophie CONCHON. Mes travaux de recherche au sein de ce laboratoire se sont orientés sur deux thématiques de recherche différentes. D'une part, l'immunothérapie du carcinome hépatocellulaire (CHC), et d'autre part, la thérapie génique de maladies génétiques.

L'équipe du Dr Sophie CONCHON s'intéresse à l'immunothérapie du CHC et a déjà démontré l'efficacité d'une immunothérapie spécifique active ciblant un antigène oncofœtal du CHC, l' α -foetoprotéine, à l'aide de différents vecteurs thérapeutiques. Mon travail de thèse dans cette thématique a consisté à évaluer l'efficacité d'une immunothérapie passive non-spécifique dans le traitement du CHC.

L'équipe du Dr Nicolas FERRY s'intéresse à la thérapie génique d'une maladie génétique hépatique, la maladie de Crigler-Najjar. Cette maladie est la conséquence de la déficience d'un gène impliqué dans l'élimination de la bilirubine. Le traitement de cette maladie par thérapie génique a déjà été évalué dans cette équipe à l'aide de différents vecteurs viraux dont l'AAVr. Mon travail de thèse dans cette thématique était d'évaluer le potentiel tumorigène de l'intégration d'un vecteur AAV dans le foie.

Ce manuscrit de thèse débutera par une introduction qui résume la pathologie du CHC, puis par une présentation des résultats obtenus dans l'immunothérapie du CHC à l'aide d'un anticorps agoniste anti-CD137 (résultats en cours de soumission) et dans l'évaluation du risque d'apparition d'un CHC lors de l'injection d'un vecteur AAV chez le rat nouveau-né (résultats publiés). Enfin, les résultats seront discutés séparément puis une conclusion résumera les principaux points de ce manuscrit.

Partie 1 : Le carcinome hépatocellulaire

Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. Les objectifs actuels sont de prévenir et de limiter l'exposition aux facteurs de risque ainsi que de dépister plus précocement la maladie pour mieux la traiter. Ces actions associées aux progrès médicaux conduisent au recul de l'incidence des cancers les plus communément retrouvés dans le monde ainsi qu'au recul de la mortalité associée.

En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Le cancer est une pathologie complexe qui diffère d'un patient à un autre dans sa manifestation, son développement et ses conséquences. Cette même hétérogénéité et variabilité se retrouvent au niveau cellulaire et moléculaire. Ces caractéristiques rendent la prise en charge de cette pathologie compliquée. Le traitement du cancer consiste à éliminer d'une part la tumeur et d'autre part l'ensemble des cellules cancéreuses afin de guérir le patient mais également de réduire le risque de récives, d'augmenter la durée de vie et d'améliorer la qualité de vie. Les principales approches sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récive du cancer.

A : Carcinogénèse et épidémiologie

Parmi les cancers primitifs du foie, le carcinome hépatocellulaire, qui se développe à partir des hépatocytes, représente le sous-type histologique majoritaire, c'est-à-dire 85 à 90% des cancers du foie dans le monde (El-Serag and Rudolph 2007). Plus rarement, d'autres tumeurs peuvent se développer, comme le cholangiocarcinome, à partir des cellules des voies biliaires, comme l'hépatoblastome de l'enfant, à partir des cellules embryonnaires du foie, ou comme l'angiosarcome, qui se développe au niveau des cellules endothéliales du foie. Le CHC est donc la forme majoritaire des cancers primitifs du foie dans le monde excepté dans quelques rares zones géographiques comme la Thaïlande où la forme majoritaire de cancer primaire du foie est le cholangiosarcome. Ceci est dû à la forte incidence d'infection des

canaux biliaires par une douve du foie (*Opisthorchis viverrini*) consommée dans le poisson cru (Shin et al. 2010).

1-Epidémiologie

Le CHC est le 7^{ème} cancer le plus commun dans le monde et le 4^{ème} cancer le plus mortel (**Figure 1**). 749 700 nouveaux cas de cancer du foie ont été diagnostiqués dans le monde en 2008, ce qui représente 5,9% des nouveaux cas de cancers totaux et 695 700 décès ont été recensés, soit 9,2% des personnes décédées d'un cancer dans le monde. En France, le carcinome hépatocellulaire est le 15^{ème} cancer le plus souvent diagnostiqué et le 5^{ème} plus mortel (Ferlay J 2010).

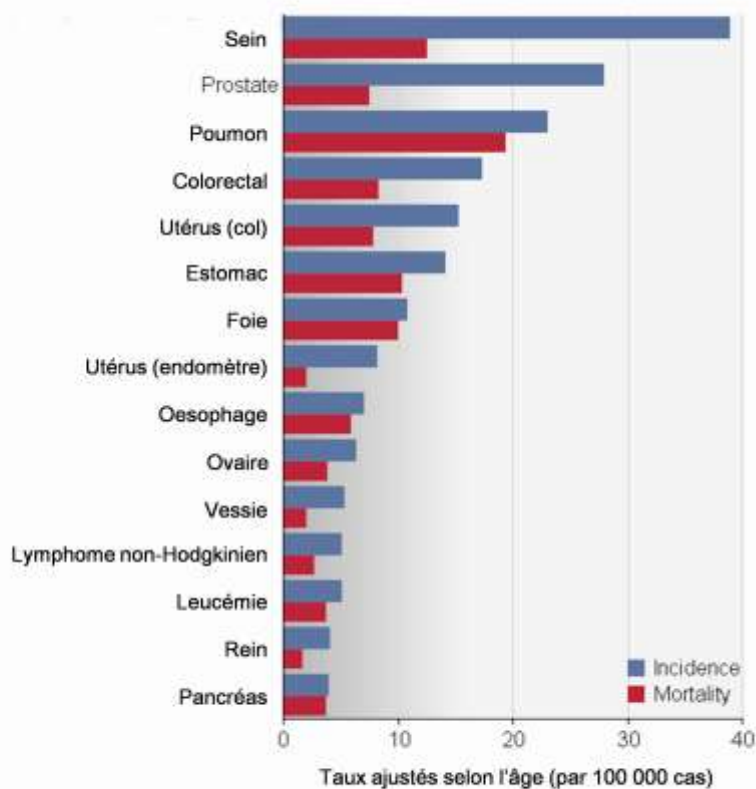


Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents dans le monde en 2008 (d'après (Ferlay J 2010))

Le CHC présente des caractéristiques épidémiologiques intéressantes comme une variation marquée de l'incidence, de la mortalité et de la prévalence selon les régions

géographiques, les groupes ethniques, et le sexe. La majorité des cas de CHC se trouvent en Afrique sub-saharienne et en Asie de l'Est (80%). La Chine à elle seule compte 50% des cas mondiaux de CHC. Les pays d'Amérique du Nord, du Sud, l'Europe du Nord, et l'Océanie quant à eux présentent une faible incidence du CHC par rapport au reste de la population. (**Figure 2**). Cette inégalité de répartition traduit la variation des facteurs étiologiques de risque associés au CHC. Dans la plupart des zones à incidence élevée, le facteur de risque majoritaire est l'infection chronique par le VHB. Le second facteur de risque majoritaire dans les zones à incidence élevée est la consommation d'aliments contaminés par l'aflatoxine B1. A l'inverse du reste de l'Asie, le facteur de risque le plus élevé au Japon est le VHC. Dans les zones à incidence faible, l'augmentation de l'incidence s'explique par l'augmentation du nombre de personnes atteintes d'une cirrhose qui est d'origine variée.

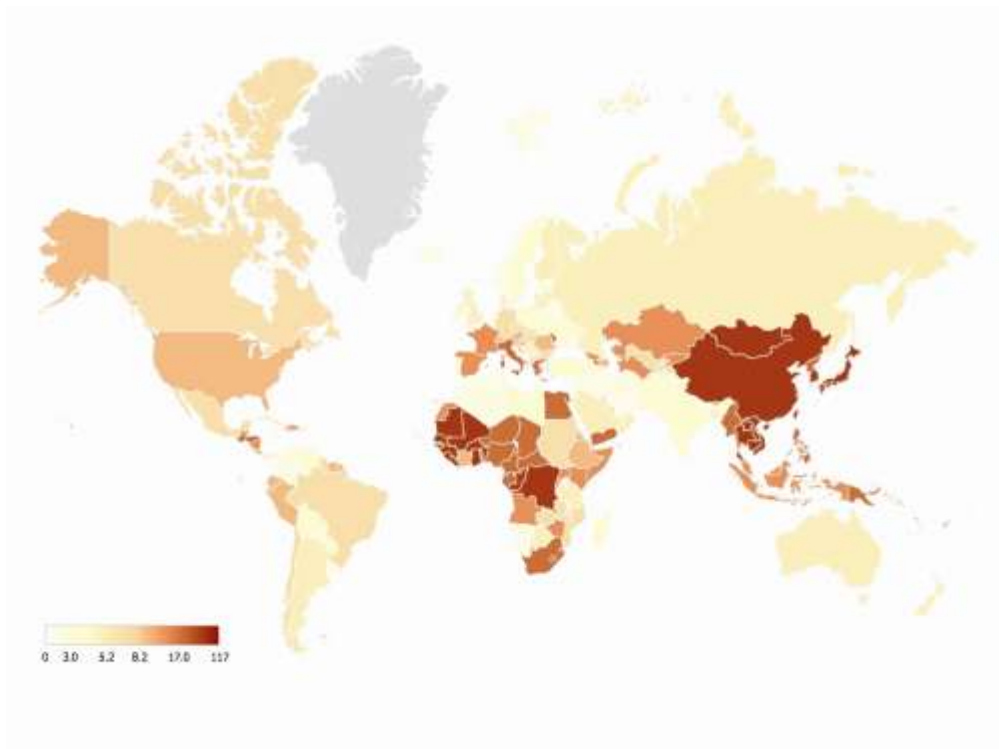


Figure 2 : Incidence du cancer du foie dans le monde en 2008 (taux par 100 000 hommes)
(d'après (Ferlay J 2010))

De plus, il existe une disparité de la distribution de l'incidence du CHC selon le sexe. Dans presque toutes les populations, les hommes ont un taux d'incidence du carcinome hépatocellulaire plus élevé que les femmes, avec un ratio homme:femme communément compris entre 2:1 et 4:1 (**Figure 3**).

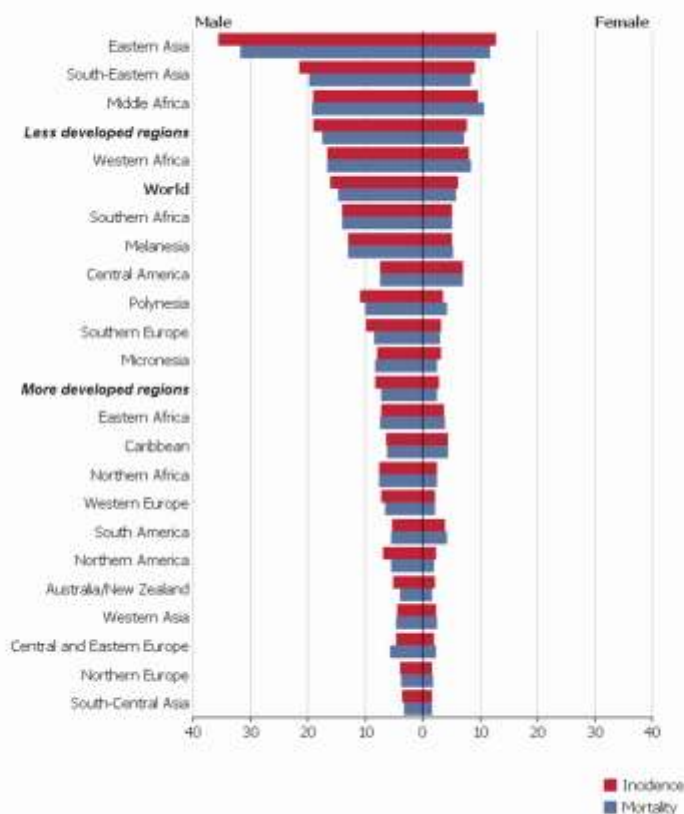


Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer du foie dans le monde ajustées selon l'âge en 2008 (d'après (Ferlay J 2010))

2-Etiologie

Les facteurs de risque associés au développement des CHC sont bien connus et les plus fréquents sont les hépatites virales B et C, la consommation excessive d'alcool, l'exposition prolongée à l'aflatoxine B1, et certaines maladies non-alcooliques ou génétiques. Dans 90% des cas de CHC, au moins un de ces facteurs de risque peut être identifié. La plupart de ces facteurs de risque conduisent à la formation et la progression d'une cirrhose, qui est présente dans 80 à 90% des patients atteints de CHC (Fattovich et al. 2004).

2.1 : Virus de l'hépatite B

L'hépatite B est la pathologie sous-jacente la plus fréquente parmi les patients atteints d'un CHC avec 400 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde. Plusieurs études ont montré que les porteurs chroniques du VHB ont 5 à 15 fois plus de risque de développer un CHC que le reste de la population. La plupart des CHC associé au VHB ont lieu sur un foie cirrhotique (70 à 90%) (Fattovich et al. 2004; Yang et al. 2011). Cependant, le VHB est une cause connue de CHC également en absence de cirrhose.

Le risque de CHC associé au VHB est d'autant plus important si l'hépatite B est endémique. Dans ces régions, la transmission du virus se fait essentiellement de la mère à l'enfant (transmission verticale) et dans plus de 90% des cas, l'infection devient chronique. Ce profil est différent dans les régions avec une incidence de CHC faible où le VHB se transmet à l'âge adulte lors de rapports sexuel ou par voie parentérale (transmission horizontale), dans ce cas, 90% des infections se résolvent spontanément (El-Serag 2012).

Deux types de mécanismes moléculaires conduiraient à la tumorigenèse induite par le VHB : direct et indirect. Un mécanisme direct car le VHB est capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte conduisant au réarrangement des gènes viraux et cellulaires et à l'instabilité des chromosomes. Plusieurs études montrent que l'insertion du génome du VHB dans les gènes cellulaires est assez fréquente et qu'elle a lieu dans des gènes qui codent pour des protéines ayant un rôle dans la signalisation, la prolifération et l'apoptose (Paterlini-Brechot et al. 2003; Murakami et al. 2005). De manière indirecte car la protéine HBx du VHB (rôle dans la réplication du virus) est capable d'agir comme un promoteur cellulaire grâce à des interactions protéines-protéines et à une régulation des voies de signalisation cytoplasmiques comme la voie Wnt/ β -caténine (Hsieh et al. 2011), ou la voie p53 (Zhang et al. 2006).

2.2 : Virus de l'hépatite C

Le risque de développer un CHC est 15 à 20 fois plus élevé chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C que chez les patients non-infectés, avec un risque d'autant plus élevé si le patient a une cirrhose ou une fibrose à un stade avancé (Aizawa et al. 2000). L'infection chronique par le VHC entraîne dans 15 à 35% des cas l'apparition d'une cirrhose

(Freeman et al. 2001). Plusieurs facteurs de risque influencent l'apparition d'un CHC chez les patients infectés par le VHC comme l'âge auquel il a été infecté (Degos et al. 2000), le sexe masculin (Walter et al. 2011), la co-infection par un autre virus comme le virus de l'immunodéficience humaine (Garcia-Samaniego et al. 2001) ou le virus de l'hépatite B (Cramp 1999). Plusieurs études menées sur les patients atteints de CHC associé au VHC n'ont pas trouvé de corrélation entre l'apparition du CHC et des facteurs viraux tels que le génotype, la charge virale, et les quasi-espèces (Niederau et al. 1998; Yoshida et al. 1999; Fattovich et al. 2001).

Le VHC n'est pas capable de rétro-transcrire son génome, donc le virus ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte. Son pouvoir d'oncogenèse s'établirait par une action de ses protéines virales au niveau de plusieurs fonctions cellulaires comme l'inhibition de l'apoptose, la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, l'activation de la transcription, de la différenciation, et de la prolifération. NS3 et NS5A seraient capables d'inhiber le gène suppresseur de tumeur p53 (Anzola 2004).

2.3 : Alcool

Plusieurs études montrent un rôle de l'alcool sur l'apparition d'une cirrhose (Corrao and Arico 1998) ou d'un CHC (Donato et al. 2002), avec une relation directe de la dose d'alcool ingérée. Une méta-analyse qui inclut 3 cohortes et 19 études montre une augmentation évidente du risque d'apparition d'un CHC avec une forte dose d'alcool ingérée.

La présence d'une cirrhose semble augmenter le risque de développer un CHC de 10 fois chez les patients alcooliques (Adami et al. 1992). Il est proposé que l'alcool induise une cirrhose dans un premier temps qui prédisposerait à l'apparition d'un CHC. L'alcool n'a pas été montré comme un agent carcinogène direct seulement c'est le facteur de risque majeur chez les patients atteints de CHC sur foie non cirrhotique (Chiesa et al. 2000).

2.4 : Aflatoxine B1

L'aflatoxine B1 est le métabolite majeur des moisissures *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus parasiticus*. Ces moisissures croissent sur différents produits alimentaires qui sont stockés dans la chaleur et l'humidité ou cultivés dans des pays à climat chaud et humide.

Plusieurs études ont trouvé une association entre le risque de CHC et l'exposition à l'aflatoxine B1 (Qian et al. 1994; Wu and Santella 2012).

Les propriétés oncogéniques de l'aflatoxine B1 se situeraient dans son élimination par le foie. En effet, le métabolisme de l'aflatoxine par les hépatocytes conduit à la production d'époxydes qui se lient de façon covalente aux guanines. Cela peut entraîner un changement de codon dans le cadre de lecture et conduire à des mutations dans certains gènes. C'est le cas pour le gène suppresseur de tumeur p53. Cette mutation est retrouvée dans 30 à 60% des cas de CHC dans les pays à faibles ressources (Kirk et al. 2005; Su et al. 2008).

2.5 : Diabète, obésité, et syndrome métabolique

Depuis quelques années d'autres facteurs de risque liés à des troubles de l'alimentation ont fait leur apparition. L'obésité, un problème majeur de santé publique avec 500 million d'adultes obèses (WHO 2008) dans le monde est compliquée par différents désordres métaboliques tels que la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'hyperlipidémie, l'hypertension, et les maladies cardiovasculaires qui sont regroupés en ce que l'on nomme le syndrome métabolique. Plusieurs études rapportent une association entre le risque de développer un CHC et l'obésité ainsi qu'à ses désordres métaboliques associés, notamment le diabète de type 2.

Une étude prospective de plus de 900 000 patients adultes américains a identifié le CHC comme le cancer le plus fréquemment associé au décès chez l'homme présentant un très fort indice de masse corporelle (Calle et al. 2003). L'association entre l'obésité et le risque d'apparition d'un CHC a été démontré par la suite par différentes études dont une méta-analyse qui rassemble les données obtenues sur 11 cohortes de patients différentes et qui montre un risque d'apparition d'un CHC augmenté que ce soit chez des patients en surpoids ou des patients obèses (Larsson and Wolk 2007). L'association entre le risque d'apparition d'un CHC et d'un diabète de type 2 a également été établi, notamment dans deux méta-analyses de cohortes de patients en Suède (Adami et al. 1996) et aux Etats-Unis (El-Serag et al. 2004) où le risque de CHC est augmenté de deux à trois fois chez les patients diabétiques. Récemment, une étude sur l'association du CHC et du syndrome métabolique a révélé une augmentation du risque d'autant plus importante s'il y a plus de deux désordres métaboliques (Turati et al. 2012).

Le risque élevé de cancer du foie associé à l'obésité et au diabète a été lié au développement d'une stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) (Sanyal et al. 2010). Cette pathologie se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie, et lorsqu'elle devient chronique, elle évolue en une forme plus sévère la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui peut aboutir à une cirrhose puis à un CHC (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003; Montella et al. 2011). Une association entre le CHC et la NAFLD/NASH a également été trouvée dans un contexte non cirrhotique (Ertle et al. 2011).

Bien que le mécanisme d'oncogenèse hépatique lors de ces pathologies ne soit pas clairement établi, l'obésité et les troubles métaboliques associés sont souvent accompagnés d'une résistance à l'insuline qui se traduit par une augmentation du niveau sérique du facteur de croissance lié à l'insuline-1 (IGF-1), un état d'inflammation chronique, un stress oxydatif, et par l'apparition d'un déséquilibre de l'expression d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires (El-Serag and Rudolph 2007; Sun and Karin 2012). Cet état inflammatoire lié à la stéatose conduit à une fibrose qui peut évoluer en cirrhose, première cause connue de formation d'un CHC.

Au vu de la très forte augmentation de personnes présentant un syndrome métabolique dans le monde, même de petites augmentations du risque lié à l'obésité ou le diabète pourrait se traduire par un grand nombre de cas de carcinome hépatocellulaire (El-Serag 2011).

2.6 : Autres facteurs de risque

Il existe également des facteurs de risque génétiques comme l'hémochromatose héréditaire (Elmberg et al. 2003), ou la maladie de Wilson (Walshe et al. 2003) qui entraînent l'apparition d'un CHC mais dans de faibles proportions et leur rôle direct dans l'oncogenèse du carcinome hépatocellulaire n'a pas été établi.

3-Développement d'un CHC

L'hépatocarcinogenèse est un phénomène étroitement lié à une pathologie chronique du foie et se développe rarement sur un foie sain. Une explication possible pour cette étroite association est que le développement du cancer dans le foie nécessite une division cellulaire

conduisant à l'acquisition au fur et à mesure de mutations génétiques indispensables à la transformation cellulaire. En faveur de cette hypothèse, la carcinogenèse induite chimiquement chez le rongeur est accélérée lorsque la division cellulaire des hépatocytes est induite par hépatectomie (Barbason et al. 1983). Toutefois, la fréquence d'erreurs de réplication dans les CHC humains est très faible, ce n'est donc certainement pas le mécanisme principal de carcinogenèse hépatique (Kawai et al. 2000). Au lieu de cela, les CHC humains sont associés à de fortes altération et translocation chromosomiques.

La condition pathologique la plus commune associée à l'hépatocarcinogenèse est la cirrhose (de 80 à 90% des cas). Elle se traduit par un développement anormal du tissu hépatique, et par conséquent au développement dans le foie d'un réseau de cicatrices fibreuses et à la régénération pathologique des cellules, qui forment des nodules de régénération (îlots de cellules viables séparées par du tissu cicatriciel). La mauvaise vascularisation de ces nodules aboutit à l'altération progressive des fonctions hépatiques. La fibrose gêne la circulation sanguine et entraîne une hypertension portale. La cirrhose se développe sur un foie chroniquement pathologique après une longue période de latence (20 à 40 ans). Le risque d'apparition d'un CHC lors d'une pathologie chronique du foie reste faible mais augmente exponentiellement lorsqu'une cirrhose se déclare. Dans 3 à 5% des cas de cirrhose, un CHC se déclare. Pour pouvoir comprendre la base moléculaire de l'hépatocarcinogenèse, il faut donc se pencher sur les mécanismes moléculaires qui augmentent la formation de la tumeur pendant la phase cirrhotique.

3.1 : Cirrhose et CHC : mécanismes moléculaires

Plusieurs phénomènes peuvent accélérer la carcinogenèse pendant la phase cirrhotique. Le raccourcissement des télomères, phénomène présent dans un foie cirrhotique (Wiemann et al. 2002), est connu pour induire la sénescence des cellules et activer la machinerie de réparation de l'ADN conduisant à des désordres chromosomiques qui pourraient être à l'origine de mutations génétiques et donc au développement d'un cancer. Par ailleurs, il a été montré que les télomères étaient dangereusement courts dans les CHC humains (Plentz et al. 2007). La formation d'une cirrhose entraîne un ralentissement de la prolifération des hépatocytes, il est donc possible que la formation de tumeur soit augmentée par perte de compétition répliquative des hépatocytes sains au profit des hépatocytes initiés. Conformément à cette

hypothèse, les agents chimiques tels que la diéthylnitrosamine (DEN) ou le 2-acétylaminofluorène (2-AAF) en activant la voie p53 stoppent la prolifération des hépatocytes sains et par conséquent accélèrent la formation tumorale chez le rat en favorisant le développement d'hépatocytes initiés (van Gijssel et al. 1997). Le microenvironnement peut également jouer un rôle dans l'accélération de la carcinogenèse. En effet, la cirrhose modifie le microenvironnement hépatique, notamment à cause de l'activation des cellules étoilées qui produisent alors des protéines de la matrice extracellulaire, des cytokines, des facteurs de croissance, et des dérivés oxydatifs du stress (Bataller and Brenner 2005). Beaucoup de ces composants ont été montrés comme altérant la prolifération des hépatocytes et donc comme pouvant augmenter la formation tumorale (résumé dans (Leonardi et al. 2012).

3.2 : Cirrhose et CHC : médiateurs

Comme décrit dans le paragraphe précédent, le raccourcissement des télomères et l'activation des points de contrôles du cycle cellulaire altère la prolifération des hépatocytes pendant la phase cirrhotique. La suppression des points de contrôle de l'ADN peut devenir un avantage sélectif permettant l'expansion clonale d'hépatocytes génétiquement altérés pendant cette phase.

Le gène suppresseur de tumeur p53 a un rôle majeur dans la limitation de la survie cellulaire et la prolifération en réponse au raccourcissement des télomères (Wright and Shay 1992), dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'activation d'oncogène (Di Micco et al. 2006), et dans la protection de l'intégrité génomique. Ainsi, la suppression du point de contrôle p53 pendant la phase cirrhotique pourrait donner un avantage sélectif aux hépatocytes possédant des télomères très courts conduisant alors à la formation d'un CHC. La délétion de p53 augmente l'instabilité chromosomique et la formation de cancer chez la souris ayant des télomères dysfonctionnels (Artandi et al. 2000). De plus, l'expression de p21 (une cible en aval de p53) est augmentée durant la cirrhose mais est perdue dans les tumeurs prénéoplasiques et les CHC (Plentz et al. 2007).

Le point de contrôle p16/Rb est également une étape importante de limitation de la prolifération cellulaire en réponse au raccourcissement des télomères, dégradation de l'ADN, et activation oncogénique (Wright and Shay 1992; Di Micco et al. 2006). Dans les CHC humains, la voie Rb/p16 est perturbée dans plus de 80% des cas avec comme cause la plus fréquente une méthylation du promoteur de p16 (Azechi et al. 2001).

Le récepteur du facteur de croissance analogue de l'insuline 2 (IGF2R) est souvent muté lors de l'hépatocarcinogenèse, dans plus de 60% des nodules dysplasiques et des CHC (Yamada et al. 1997). Ce récepteur régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la motilité et l'inhibition de l'apoptose notamment par activation de la voie du TGF β (Dennis and Rifkin 1991).

Il existe d'autres causes de formation d'un CHC en plus des processus d'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire, ce sont l'activation de voies de signalisation oncogéniques.

La voie Wnt/ β -caténine dans des conditions normales conduit à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que c-myc, ou la cycline D1, dans l'angiogenèse, dans l'inhibition de l'apoptose et la formation de la matrice extracellulaire (**Figure 4**) (résumé dans (Avila et al. 2006)). Dans 50 à 70% des CHC, la β -caténine est accumulée dans le cytoplasme et le noyau des cellules tumorales mimant ainsi les effets de l'activation de la voie Wnt (Wong et al. 2001). La délétion du gène suppresseur de tumeur APC (adenomatosis polyposis coli) et par conséquent l'activation de la voie β -caténine, suffit à induire l'hépatocarcinogenèse dans des modèles murins (Colnot et al. 2004).

La voie Ras/Raf/MEK/ERK joue un rôle central dans la prolifération cellulaire et la survie, la transduction de signaux à travers une série de phosphorylations spécifiques qui démarre avec l'activation de Ras (résumé dans (Alexia et al. 2004)). La surexpression de Ras est fréquemment observée dans les CHC et les foies prénéoplasiques (Coleman 2003).

La stimulation des récepteurs de croissance conduisant à l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR entraîne l'activation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. L'activation de la voie Akt et l'altération de l'expression de la phosphatase PTEN qui est un inhibiteur d'Akt, sont présentes dans 40 à 60% des CHC humains (Hu et al. 2003).

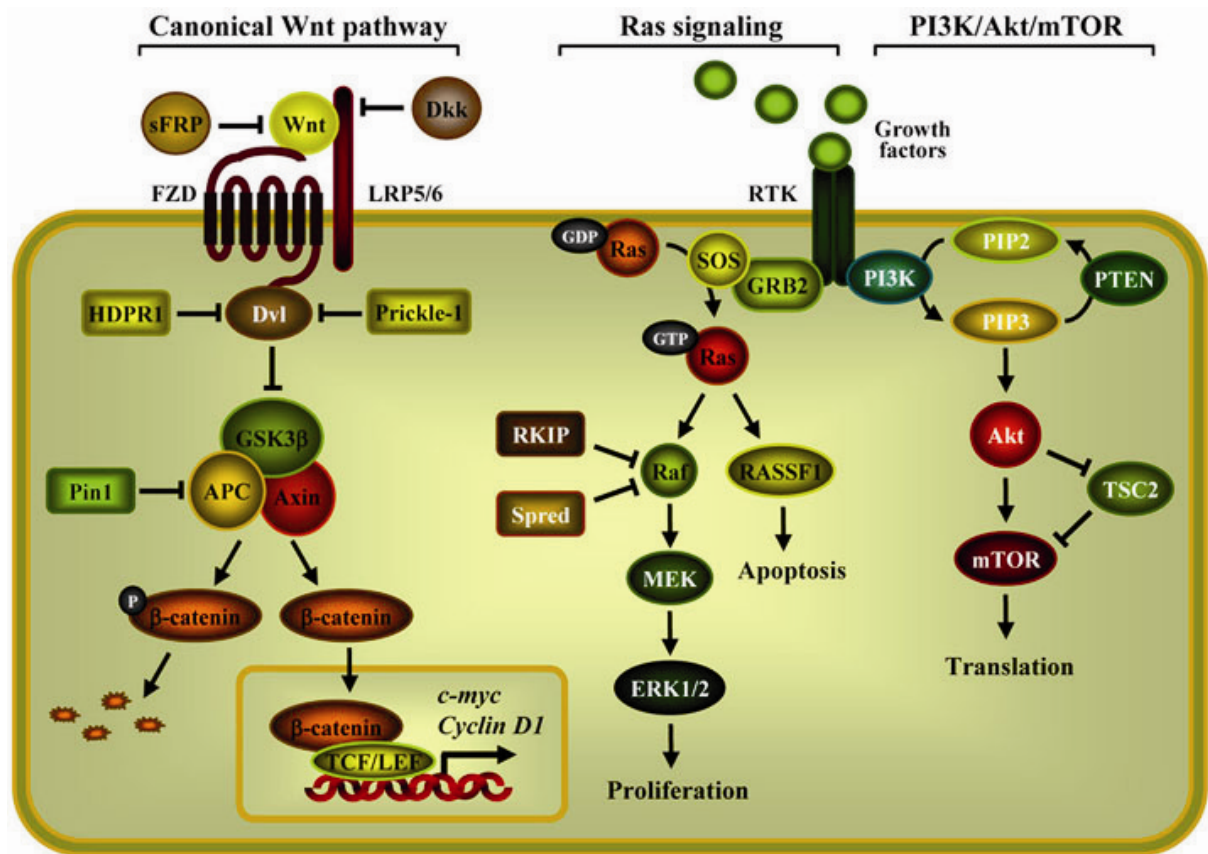


Figure 4 : Principales voies de signalisation oncogéniques activées lors d'un CHC (d'après (Yam et al. 2010))

Dans la voie de signalisation Wnt, l'engagement de Wnt sur son récepteur FZD et son co-récepteur LRP5/6 active la protéine Dvl conduisant à la dissociation du complexe responsable de la dégradation de la β -caténine. L'accumulation de la β -caténine facilite la translocation de la protéine dans le noyau où elle s'associe avec les facteurs de transcription TCF/LEF et initie la transcription de leurs gènes cibles, comme *c-myc* ou la cycline D1. Les inhibiteurs de cette voie (sFRP, Dkk, HDPR1, Pin1 et Prickle1) sont illustrés sur le schéma. La voie de signalisation Ras est initiée par l'engagement de RTK avec des facteurs de croissance. Ras est alors activée par SOS (Son of sevenless protein). Raf-1 est un effecteur direct de Ras qui transduit le signal par l'action de MEK et ERK1/2. Le contrôle de la voie se fait par RKIP et Spred qui sont des inhibiteurs de Raf-1. RASSF1 est également un effecteur direct de Ras qui agit sur l'apoptose. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est également activée par l'engagement du récepteur RTK par des facteurs de croissance, ce qui permet l'activation de la PI3K dont le contrôle passe par l'inhibiteur PTEN. Akt est une cible de la cascade initiée par la PI3K qui transduit le signal via mTOR. Un rétro-contrôle de l'activation d'Akt s'effectue par l'inhibiteur TSC2.

En conclusion, le développement d'un CHC au niveau moléculaire est un phénomène complexe dépendant de la pathologie hépatique mais également des facteurs environnementaux.

B : Prise en charge du carcinome hépatocellulaire

Les caractéristiques anatomo-pathologiques du CHC et la maladie sous-jacente du foie ont donné lieu à différents systèmes de classification du CHC qui avaient pour but de regrouper des patients aux pronostics identiques et de sélectionner le traitement le plus adapté. Les plus connues sont la classification TNM (Tumor Node Metastasis), les critères d'Okuda, le score CLIP (Cancer of the Liver Italian Program), ou encore le score BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer). La classification la plus complète à l'heure actuelle est la classification BCLC car elle permet de donner un meilleur pronostic évolutif puisqu'elle tient compte non seulement du stade de la tumeur comme les autres systèmes de classification, mais également de la fonction hépatique (score Child-Pugh), de l'état général du patient et des symptômes associés (de Lope et al. 2012).

Seulement, à un stade palliatif, les patients ayant un score BCLC identique ont une évolution très variable de leur maladie. L'incorporation d'une classification moléculaire des CHC peut être nécessaire pour mieux prédire l'évolution de la maladie mais également pour adapter les traitements. Cela représente cependant un challenge du fait de la complexité moléculaire des CHC développés sur un organe pathologique (cirrhose) et d'étiologies très variables (alcool, VHC, VHB, stéato-hépatite non alcoolique...) avec des voies de carcinogenèse différentes selon les causes (Villanueva et al. 2007). La première étude de classification moléculaire des CHC a été réalisée en 2004 et a permis d'identifier deux types de CHC, un CHC de type hépatocytaire et un CHC de type progéniteur foetal au pronostic plus sombre (Lee et al. 2004). Une classification moléculaire plus complète prenant en compte les altérations chromosomiques, les mutations, la méthylation des promoteurs, le transcriptome et une analyse protéique a permis d'identifier 6 groupes homogènes de pronostic différent corrélés à l'étiologie et à l'activation de voies de signalisation (Boyault et al. 2007). L'homogénéité des groupes identifiés et leur corrélation aux voies de signalisation cellulaire pourrait permettre l'intégration de cette classification dans les futurs essais thérapeutiques et donc une approche de traitement individualisée devient possible.

1-Prévention et surveillance

L'infection par le virus de l'hépatite B étant un facteur de risque connu du CHC et un vaccin contre le VHB étant disponible, des campagnes de vaccination contre le VHB ont été menées dans les populations à risque et ont permis de réduire très significativement le nombre de personnes infectées et par conséquent de diminuer le nombre de cas de CHC associé au VHB (Zanetti et al. 2008).

90% des CHC se déclarent sur un foie cirrhotique. Afin de prévenir la survenue d'un CHC ou de le traiter à un stade précoce, une échographie associée à un dosage sérique de l' α -foetoprotéine est pratiquée tous les 6 mois chez les patients cirrhotiques. Cet intervalle de temps représente le délai moyen nécessaire pour que la taille d'un petit CHC passe de 1 cm à 3 cm et devienne ainsi visible à l'échographie (Rosmorduc 1999). L' α -foetoprotéine est une protéine oncofœtale ré-exprimée dans 50 à 80% des patients atteints de CHC (Butterfield 2007). Cependant, cette protéine n'est pas un marqueur parfait car elle n'est pas détectée dans les CHC débutants (lésions de 1 à 2cm), et est détectée chez des patients atteints d'hépatite B sans preuve d'un CHC (Bae et al. 2005). D'autres marqueurs sériques ont été identifiés pour compléter la sensibilité du diagnostic d'un CHC, comme le glypican-3. Ce protéoglycane oncofœtal est ré-exprimé dans 80% des CHC et n'est pas exprimé chez des patients sains, cirrhotiques, ou atteints d'hépatite virale (Capurro et al. 2003).

Le traitement d'un CHC repose sur sa classification, sur le score attribué (i) au CHC et (ii) à la fonction hépatique du patient. Selon le score obtenu, le patient reçoit un traitement curatif afin de détruire les foyers néoplasiques ou palliatif afin de prolonger la durée de vie des patients et limiter le risque de récurrence (Jean-Claude Barbare et al. 2011).

2-Traitements curatifs

2.1 : Résection chirurgicale

Le traitement chirurgical est le premier privilégié. La résection de la tumeur et la transplantation hépatique ont d'excellents résultats chez les patients dépistés précocement. La résection chirurgicale est un traitement de choix chez les patients non-cirrhotique chez lesquels les plus importantes résections sont très bien tolérées. Cependant, cette stratégie

chez les patients cirrhotiques est associée à une plus forte mortalité et morbidité. Dans certains cas, quand la localisation du CHC le permet, la résection chirurgicale est plus indiquée si elle est pratiquée par laparoscopie puisque le risque de morbidité et la durée de l'hospitalisation est raccourcie sans augmenter le risque de récurrence (Zhou et al. 2011). Les résultats de cette chirurgie sont liés au nombre et à la taille des nodules et également à la pathologie hépatique sous-jacente puisque les patients présentant un CHC unique sans hypertension portale et élévation de la bilirubine ont un taux de survie à cinq ans de plus de 70% alors qu'il est de moins de 20% si un seul de ces critères n'est pas respecté (Llovet et al. 1999). Cependant, le risque de récurrence est important puisque la récurrence tumorale complique 50% des cas à trois ans.

2.2 : Transplantation

La transplantation hépatique est le meilleur traitement curatif du CHC sur un foie cirrhotique et le seul qui permette le traitement du cancer et de la maladie sous-jacente. Les meilleurs résultats ont été observés chez des patients sélectionnés sur les critères de Milan suivants : un nodule unique de moins de 5cm ou si CHC multinodulaires, 3 nodules de moins de 3cm, sans invasion vasculaire ou propagation extrahépatique. Ces critères d'éligibilité permettent d'obtenir une survie globale à 10 ans de 70% (Mazzaferro et al. 1996). Quelques auteurs ont suggéré que les critères de Milan étaient trop stringents et que les étendre pourraient permettre l'inclusion de quelques patients supplémentaires comme cette étude rétrospective qui montre qu'en passant à sept critères plutôt que d'inclure uniquement des patients éligibles selon les critères de Milan, le nombre de patients inclus pouvait être étendu en ayant le même taux de survie globale de 70% à 5 ans (Mazzaferro et al. 2009). Cette proposition reste toutefois à l'étude car le nombre de greffons demeure toujours limité.

2.3 : Destruction percutanée

La destruction percutanée de la tumeur est la meilleure option pour les CHC non chirurgicaux. Elle consiste au guidage par l'imagerie d'une sonde ou d'une aiguille directement dans la tumeur en vue d'un acte thérapeutique. L'ablation est obtenue par injection de substances chimiques toxiques ou par changement thermique (radiofréquence, cryothérapie ou laser). Les plus utilisées sont l'injection percutanée d'éthanol (IPE) et la radiofréquence.

Ces deux techniques présentent de bons résultats sur des tumeurs égales ou inférieures à 2cm. Bien qu'il y ait plus de complications associées à la radiofréquence qu'à l'IPE, des méta-analyses comparant l'efficacité des deux techniques montrent de meilleurs résultats pour la radiofréquence sur la survie générale d'un CHC précoce, plus particulièrement sur des tumeurs supérieures à 2cm (Germani et al. 2010). Le taux de récurrence après un traitement par voie percutanée est aussi élevé que pour la résection chirurgicale et il peut atteindre 80% en 5 ans (Lencioni et al. 2005). Une amélioration des techniques d'ablation ou l'addition de thérapies adjuvantes après le traitement pourrait être envisagée afin de réduire le risque de récurrence et augmenter le taux de survie globale.

3-Traitements palliatifs

Ce type de traitement est utilisé essentiellement pour prolonger la survie du patient et limiter le risque de récurrence chez des patients qui ne sont plus éligibles à la transplantation ou à la chirurgie, ou en complément d'autres traitements.

La chimio-embolisation artérielle est la thérapie palliative la plus utilisée pour traiter le CHC combinée ou non avec une chimiothérapie systémique (5-fluorouracile) chez les patients non éligibles à la chirurgie et à la destruction percutanée. Elle est basée sur la propriété de forte vascularisation du CHC. Elle consiste à administrer des agents chimiques suivis d'une occlusion des artères nourricières, ce qui entraîne la nécrose de la tumeur et le ralentissement de sa croissance. Deux importantes méta-analyses d'essais cliniques randomisés ont conclu à un effet bénéfique sur la survie globale des patients ayant reçu ce traitement (Camma et al. 2002; Llovet and Bruix 2003). Plusieurs agents chimiques sont utilisés en chimio-embolisation. Les plus communs étant la doxorubicine, la cisplatine, le lipiodol, combinés ou non (1995; Pelletier et al. 1998; Marelli et al. 2007).

Un autre traitement basé sur l'administration d'agents radioactifs en intra-artériel est utilisé pour éradiquer la tumeur, il s'agit de la radio-embolisation. Il n'y a pas d'essais cliniques randomisés qui comparent ce traitement aux autres traitements mais les résultats obtenus chez les patients ayant reçu l'yttrium-90 par radio-embolisation sont encourageants en terme de sûreté et de réponse radiologique avec une amélioration de la survie globale comparable à celle obtenue avec un traitement par chimio-embolisation (Salem et al. 2011).

L'augmentation des connaissances des voies de signalisation de la carcinogenèse ont permis le développement de nouveaux traitements palliatifs utilisant les caractéristiques

moléculaires du CHC comme cible thérapeutique. Le sorafénib, un inhibiteur de plusieurs kinases aux propriétés anti-angiogénique et antiproliférative, a montré une augmentation de la survie dans deux essais cliniques randomisés, de 3 mois dans un cas et de 2,5 mois dans l'autre (Llovet et al. 2008; Cheng et al. 2009). Bien que l'effet clinique observé soit modéré, le sorafénib est devenu aujourd'hui le traitement « standard » des CHC avancés et de nombreux essais cliniques sont en cours avec cette molécule pour évaluer son efficacité lorsqu'elle est combinée avec d'autres traitements chirurgicaux ou non (clinicaltrials.gov). D'autres molécules ciblant des voies de signalisation dans le traitement du CHC sont en cours d'évaluation (Villanueva and Llovet 2011).

Bien que les résultats de ces thérapies soient encourageants, les effets cliniques observés sont modestes et il existe toujours un risque de récurrence très important notamment dû à la prise en charge tardive du CHC. Pour prévenir cette récurrence, les traitements évoluent au profit de thérapies combinées et de thérapies émergentes. Dans cette catégorie se place l'immunothérapie qui n'est pas reconnue à l'heure actuelle comme un traitement dans la prise en charge du CHC. Le rationnel d'utilisation de cette thérapie dans le traitement du CHC et les résultats obtenus seront discutés dans le paragraphe D.

C : Modèles de CHC

Bien qu'il existe des différences assez importantes entre la physiologie d'une souris et celle d'un homme, les modèles animaux sont très importants pour tester de nouvelles thérapies. Les approches d'immunothérapie par exemple, sont des thérapies systémiques qui visent à exploiter le système immunitaire dans son ensemble. Un modèle expérimental avec des structures lymphoïdes primaires et secondaires va ainsi permettre d'obtenir des informations essentielles sur l'induction et la régulation de la réponse immunitaire induite par l'immunothérapie. Les résultats d'études précliniques sur le modèle murin de CHC fournissent des informations importantes qui sont confirmées dans les essais cliniques humains (Butterfield 2004).

Les modèles de CHC implantés sont les modèles les plus utilisés dus à leur facilité d'utilisation et de mise en place pour l'évaluation de traitements précliniques. Des lignées

tumorales de CHC peuvent être introduites dans la souris receveuse. Il peut s'agir d'allogreffes de cellules ou de fragments tumoraux de CHC murins dans des souris syngéniques ou non ou de xénogreffes de cellules ou de fragments de CHC humains dans des souris immunodéficientes nude ou SCID (severe combined immunodeficient). Ces implantations peuvent être ectopiques, les cellules tumorales sont injectés en sous-cutané, ou orthotopiques, dans ce cas l'injection tumorale est intrahépatique.

Le modèle ectopique présente l'avantage d'être facilement généré et de permettre une mesure de la croissance tumorale aisée. Cependant, il peut exister de très grandes variabilités selon la lignée cellulaire utilisée dans les modèles de xénogreffes, il est donc nécessaire de tester plusieurs lignées. De plus, ce type de modèle ne prend pas en compte le microenvironnement physiologique qui joue un rôle important dans le comportement des cellules tumorales, ce qui fait que la ressemblance entre ces tumeurs et les tumeurs humaines est assez éloignée (Kelland 2004). Ainsi, les résultats thérapeutiques obtenus dans des modèles ectopiques doivent être confirmés dans des modèles orthotopiques.

Le modèle orthotopique permet d'être dans des conditions plus intrinsèques, avec l'avantage d'une prise tumorale rapide. L'inconvénient de ce modèle est que l'inoculation des cellules tumorales est très invasive et la croissance tumorale est difficile à déterminer. Toutefois, il permet d'étudier le potentiel métastatique de la tumeur, ce qui n'est pas le cas lorsque les lignées sont implantées en sous-cutané. Ces caractéristiques rendent ce modèle plus transposable à l'homme que le modèle sous-cutané.

Initialement, les modèles murins modifiés génétiquement ont été créés pour mimer les caractéristiques moléculaires et physiopathologiques d'un CHC (Tuveson and Jacks 2002). Ce genre de modèle facilite la recherche détaillée des voies de signalisation de carcinogenèse *in vivo* (Frese and Tuveson 2007). L'expression spécifique du tissu est obtenue par la création de constructions d'ADN sous le contrôle de promoteurs restreints à certains tissus. L'inconvénient majeur de ce type de modèle est que la mutation est constitutive et donc même si le gène est sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu, la mutation est présente dans toutes les cellules du tissu. Il existe plusieurs modèles transgéniques de CHC. On peut citer les modèles transgéniques exprimant des gènes viraux, notamment des gènes des virus des hépatites B et C surtout utilisés pour comprendre les interactions protéines virales-protéines de l'hôte responsables de la carcinogenèse (Lerat et al. 2002; Xiong et al. 2003), mais également les

modèles transgéniques de surexpression d'oncogènes comme les souris transgéniques exprimant constitutivement c-myc (Thorgeirsson and Santoni-Rugiu 1996) ou la β -caténine (Harada et al. 2004).

Les modèles de CHC les plus pertinents sont les modèles induits chimiquement car ils présentent une grande similitude avec le cycle de carcinogenèse hépatique observé chez l'homme, à savoir une phase d'initiation où l'hépatocyte subit des dommages génétiques, suivi d'une phase de promotion où les hépatocytes initiés se divisent pour former des foyers pré-néoplasiques, et enfin une phase de progression où les foyers pré-néoplasiques prolifèrent et deviennent des CHC avérés (Pitot and Dragan 1991).

Plusieurs agents chimiques sont capables d'induire une formation tumorale lorsqu'ils sont administrés à une dose suffisante. Il existe deux catégories de carcinogènes, les composés génotoxiques qui induisent des changements structuraux des molécules d'ADN, et les composés promoteurs qui accélèrent la formation tumorale après initiation par un composé hépatotoxique (résumé dans (Heindryckx et al. 2009)). Les composés génotoxiques comme la diéthylnitrosamine (DEN) peuvent jouer le rôle d'initiateur de la carcinogenèse du fait de leur capacité à induire des mutations dans l'ADN génomique mais aussi celui de promoteur lorsque la dose est suffisamment élevée ou l'exposition suffisamment longue (Williams et al. 2000). Les composés promoteurs de carcinogenèse comme le 2-acétylaminofluorène (2-AAF) permettent la prolifération de cellules tumorales initiées (Williams et al. 2000). Ils peuvent être initiateurs (par modification de l'expression de gènes) mais leur caractéristique principale réside surtout dans le fait qu'ils ont un effet hépatotoxique réversible après arrêt de l'exposition au composé notamment car ils ne sont pas génotoxiques. La phase de progression est quant à elle obtenue par hépatectomie chez l'animal adulte ou par croissance naturelle du foie lorsque le composé génotoxique est injecté chez le très jeune animal.

Chez la souris, la DEN est classiquement administrée en une unique injection intrapéritonéale à 5 μ g/g au souriceau de 12 ou 15 jours en intrapéritonéal (Vesselinovitch and Mihailovich 1983; Hacker et al. 1991). A cette dose, la DEN agit comme agent initiateur de tumeur mais également comme promoteur, et couplée à la croissance hépatique normale, elle permet d'obtenir après 45 semaines, le développement d'un CHC chez la totalité des mâles issus de la génération F1 d'un croisement entre les lignées C57Bl/6 et C3H/HeN.

Chez le rat, il existe un modèle largement utilisé qui combine les propriétés de la DEN, du 2-AAF et de la prolifération hépatique afin d'obtenir un CHC rapidement : le modèle de Solt-Farber (Solt et al. 1977). Ce modèle peut être ajusté en remplaçant l'hépatectomie partielle, associée à une mortalité élevée, par la croissance naturelle du foie en administrant la DEN et le 2-AAF chez le jeune animal (Espandiari et al. 2005).

D : Immunothérapie

Le concept d'immunosurveillance des cancers par le système immunitaire a été proposé pour la première fois par Paul Ehrlich puis par Burnet et Thomas qui ont émis l'hypothèse que les cellules de l'immunité joueraient un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. Ce concept a été confirmé par des travaux réalisés chez la souris où les auteurs montrent que des souris ayant reçu au préalable des cellules tumorales irradiées rejettent le challenge tumoral démontrant ainsi la présence d'une résistance de l'hôte à la tumeur (Klein et al. 1960). Le rôle du système immunitaire dans cette résistance a depuis été largement démontré, notamment par des expériences impliquant les lymphocytes T CD8 cytotoxiques dans le contrôle et l'élimination des tumeurs (résumé dans (Benchetrit et al. 2003)). De plus, la présence d'infiltrats lymphocytaires dans la tumeur est corrélée à un bon pronostic clinique dans de nombreux cancers (Pages et al. 2010).

Depuis ces 20 dernières années, l'immunothérapie apparaît être un nouveau choix thérapeutique de traitement du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur. Parmi les avancées et les découvertes fondamentales, on peut citer l'identification d'antigènes tumoraux, les connaissances plus approfondies des réponses innée et adaptative tant au niveau cellulaire que moléculaire, et la compréhension des mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance.

Dans la réponse anti-tumorale, on peut distinguer les cellules de la réponse immunitaire innée et celles de la réponse immune adaptative. Les cellules du système immunitaire inné sont les premières cellules à rentrer en jeu dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Elles reconnaissent des signaux de danger produits par les tumeurs suite à leur différenciation cellulaire et à la perturbation du microenvironnement. Dans des conditions optimales, cela

engendre une forte réponse inflammatoire qui d'une part, active les cellules effectrices de l'immunité innée notamment les cellules NK, et d'autre part stimule les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), particulièrement les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. Celles-ci phagocytent les antigènes associés/dérivés des tumeurs et déclenchent une réponse immunitaire adaptative efficace.

Parmi ces cellules de l'immunité adaptative, on peut distinguer les lymphocytes B qui sont acteurs de la réponse humorale conduisant à la sécrétion d'anticorps, mais surtout les lymphocytes T auxiliaires (Th) et cytotoxiques (CTL) qui sont les médiateurs de la réponse cellulaire conduisant à la lyse des cellules tumorales (**Figure 5**).

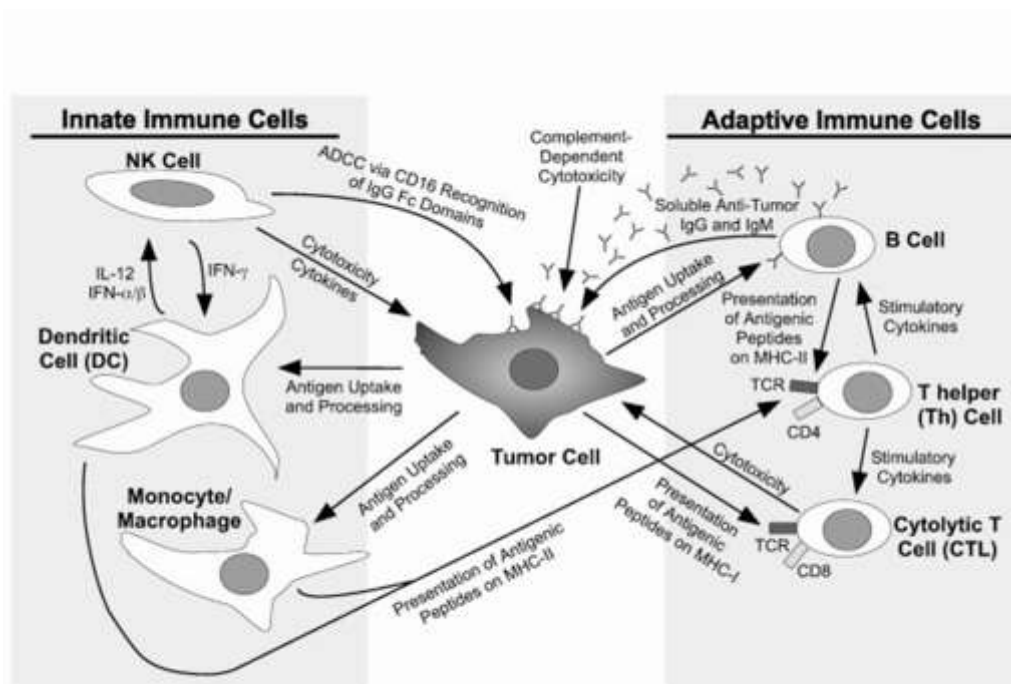


Figure 5 : Principaux types cellulaires ayant un rôle dans les réponses innée et adaptative anti-tumorales (d'après (Borghaei et al. 2009))

Les principaux types cellulaires de l'immunité innée (NK, cellules dendritiques, monocytes et macrophages) et de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) sont représentés dans les zones grisées. Les flèches représentent les interactions que ces cellules ont avec les autres types cellulaires et la tumeur. Les cellules de l'immunité innée conditionnent la réponse immunitaire adaptative en présentant les antigènes tumoraux aux cellules immunes adaptatives et en créant un microenvironnement inflammatoire au sein de la tumeur. Les cellules adaptatives exercent alors leur fonction pour éliminer la tumeur.

A partir de ces connaissances, plusieurs approches peuvent être entreprises dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale. Leur objectif principal est la génération et le maintien de la réponse immunitaire anti-tumorale à travers la capacité lytique des effecteurs cellulaires (CTL et NK). Les deux principales approches d'immunothérapie sont : l'immunothérapie passive qui consiste à injecter soit des anticorps monoclonaux spécifiques, soit des lymphocytes effecteurs activés *ex vivo* (transfert adoptif) (Dudley et al. 2008), et l'immunothérapie active ou vaccination, visant à activer les cellules effectrices *in vivo*. L'identification de nombreux antigènes associés à la tumeur (TAA) a vu émerger de nombreux essais visant une stratégie d'immunisation active. Les vaccins contre les cancers sont ainsi devenus une réalité et connaissent un véritable engouement.

1-Rationnel d'une immunothérapie pour un CHC

Le traitement le plus efficace actuellement pour éliminer un CHC est la transplantation hépatique. Seulement, le nombre de greffons est limité et ce traitement comme les autres traitements curatifs du CHC ne sont applicables qu'à un nombre limité de patients et ils ne préviennent pas la récurrence qui survient dans près de 70% des cas dans les 5 ans.

L'immunothérapie apparaît être une approche complémentaire rationnelle pour limiter ce risque de récurrence pour plusieurs raisons. Tout d'abord, une étude sur 163 patients montre que l'infiltration de lymphocytes T dans la tumeur est associée à un bon pronostic clinique suggérant une réponse anti-tumorale efficace (Wada et al. 1998). De plus, le CHC est une tumeur qui exprime de nombreux TAA différents et peut donc être l'objet de stratégies d'immunothérapie différentes. En effet, MAGE-1 et MAGE-3 sont exprimés dans 46 à 80% des tissus réséqués de CHC (Kobayashi et al. 2000), NY-ESO-1 est quant à lui exprimé dans 25% des CHC (Koranyi et al. 2004). Les plus connus car devenus aujourd'hui des marqueurs sériques d'identification d'un CHC sont deux antigènes oncofœtaux : l' α -fœtoprotéine (AFP) et le glypican-3 (GPC3) (Filmus and Capurro 2004). Enfin, le foie est un organe immunologique particulier avec un passé d'organe lymphoïde, une fonction de détoxification et de tolérance alimentaire et il est fortement irrigué par la circulation sanguine et donc facilement accessible et infiltrable par les cellules immunitaires effectrices.

2-Système immunitaire hépatique

La fonction du système immunitaire hépatique est complexe car elle doit allier tolérance des antigènes alimentaires avec éradication des organismes étrangers. En effet, le foie est un des centres majeurs de l'activité métabolique de digestion, de synthèse des protéines plasmatiques, et de détoxification. Pour assurer ses différents rôles, le foie reçoit le sang de deux sources différentes : environ 20% du sang est artériel provenant de l'artère hépatique, l'autre majeure partie du sang provient du système intestinal via la veine porte. C'est à travers le système portal que la majorité des antigènes sont apportés. Ainsi, les récepteurs de type PRR (pattern recognition receptor) et les TCR spécifiques de leur antigène peuvent être exposés à leur ligand dans le foie. Il existe plusieurs types cellulaires, certains propres au foie, capables de générer différents signaux conduisant à une réponse immunitaire appropriée. Il est donc intéressant d'analyser les différentes populations de cellules non parenchymateuses du système immunitaire hépatique pour comprendre le rôle particulier du foie et son intérêt pour une immunothérapie.

Le foie contient une population diversifiée de cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (**Figure 6**). Le foie est l'organe le plus riche en lymphocytes non conventionnels (NKT et $LT\gamma\delta$) qui jouent un rôle très important dans l'immunité innée. Dans le cas d'un CHC, les $LT\gamma\delta$ sont en nombre beaucoup plus faible et fonctionnellement déficients dans la tumeur par rapport aux $LT\gamma\delta$ présents dans le parenchyme adjacent (Yi et al. 2012). Les NKT sont en nombre plus important dans le foie que dans le sang circulant chez l'homme (Norris et al. 1998) et ont été associés à un mauvais pronostic lorsqu'ils sont intratumoraux chez des patients atteints d'un CHC (Cariani et al. 2012). Les NK appelés cellules Pit dans le foie sont abondants et sont des cellules effectrices très efficaces avec une cytotoxicité 4 à 8 fois supérieure à celle des NK sanguins. Elles présentent une forte activité cytolytique spontanée contre les tumeurs (Vermijlen et al. 1999). Chez des patients atteints d'un CHC, la présence de NK dans la tumeur corrèle avec un bon pronostic clinique (Chew et al. 2012). Les lymphocytes T sont abondants dans le foie avec une proportion de lymphocytes conventionnels CD4:CD8 (1:3,5) changée par rapport au sang circulant (2:1) (Parker and Picut 2005) et une prédominance de lymphocytes activés (Tu et al. 2007). Le nombre important de $LT\ CD8$ dans la tumeur a été inversement corrélé à une progression du CHC et donc associé à un bon pronostic clinique (Chew et al. 2010). La présence de $LT\ CD4$ dans un CHC peut être

associée à un bon ou un mauvais pronostic clinique selon qu'ils soient cytotoxiques (Fu et al. 2012) ou régulateurs (Pedroza-Gonzalez et al. 2013).

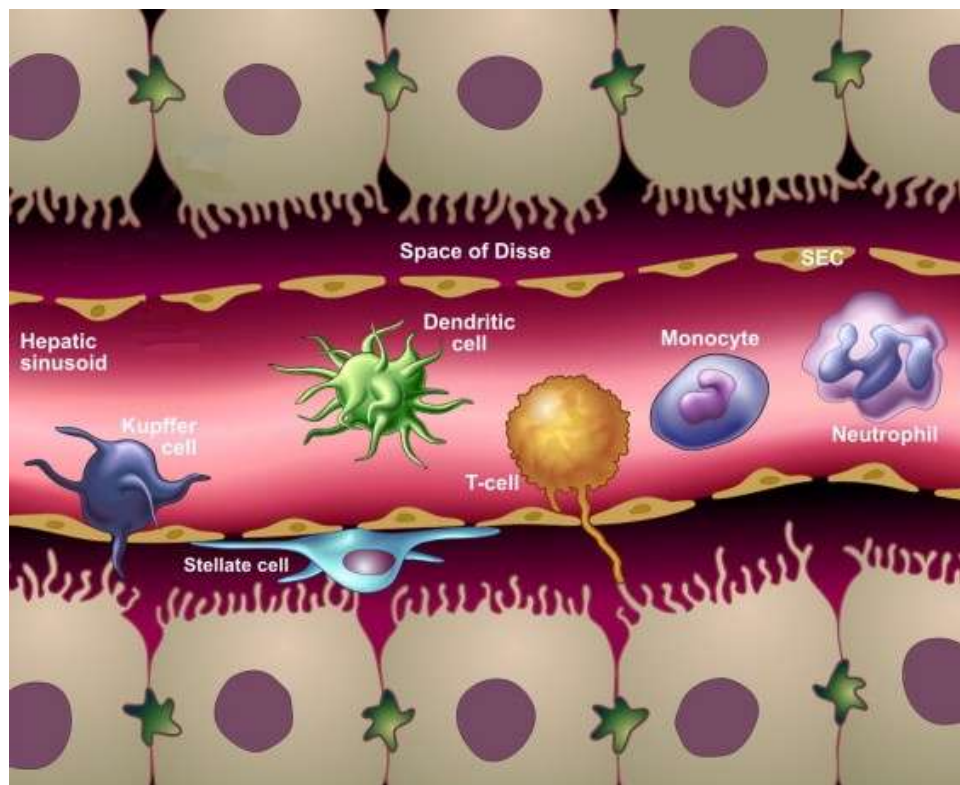


Figure 6 : Espace sinusoidal hépatique (d'après (van Golen et al. 2012))

Les sinusoides hépatiques sont séparés des hépatocytes par l'espace de Disse où les cellules étoilées sont présentes. Les parois des vaisseaux sanguins sont constituées de cellules endothéliales sinusoidales (SEC) qui sont en étroit contact avec les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer). La paroi des sinusoides est fenestrée et permet le contact voire le passage des cellules immunes (lymphocytes T, monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles,...) dans le parenchyme hépatique lors d'une inflammation.

La plupart des cellules présentes dans le foie sont capables de présenter des antigènes aux cellules du système immunitaires. Les hépatocytes qui constituent les 2/3 des cellules du foie expriment abondamment les molécules de CMH I mais n'expriment pas de molécules du CMH II chez l'adulte sain, ce qui n'est pas toujours vrai sur un foie atteint d'hépatite suggérant un possible rôle de présentation antigénique des hépatocytes (Herkel et al. 2003). Les cellules endothéliales sinusoidales expriment des molécules de présentation (CMH II) et de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) ressemblant au phénotype des cellules dendritiques (Lohse et al. 1996). Les cellules étoilées hépatiques, aussi appelées cellules de Ito sont des cellules peu

différenciées présentes essentiellement dans l'espace de Disse et jouent un rôle important dans l'inflammation hépatique (Vinas et al. 2003).

Un des sous-types cellulaires majeur et très important dans le foie est la cellule de Kupffer qui est le macrophage spécifique du foie et qui constitue 20% des cellules non parenchymateuses hépatiques. Leur rôle principal est de phagocyter les débris et micro-organismes provenant du sang portal, et elles sont capables selon les signaux reçus lors de la réponse immunitaire innée de conditionner toute la réponse immunitaire adaptative selon le phénotype qu'elles vont acquérir. Par exemple, elles sont capables d'acquérir un phénotype de cellules présentatrices d'antigènes et d'activer les lymphocytes T CD8 et CD4 (Lohse et al. 1996) ou de devenir tolérogènes et de sécréter de fort taux d'IL-10 (Knolle et al. 1995). On peut distinguer deux sous-types de macrophages, les macrophages classiques ou M1 et les macrophages alternatifs ou M2. Les lipopolysaccharides bactériens et les cytokines de type Th1 surtout l'IFN γ orientent les macrophages vers une type M1 tandis que les macrophages M2 sont induits par l'IL4. En général, les macrophages M2 exercent une activité immunorégulatrice, participent à une réponse Th2, suppriment l'inflammation, augmentent le remodelage tissulaire, en particulier lors de la progression tumorale (Shirabe et al. 2012). La présence de macrophages dans un CHC a été le plus souvent corrélée à un mauvais pronostic (Zhu et al. 2008; Ding et al. 2009) sauf dans une étude (Li et al. 2009). Seulement, aucune de ces études n'a caractérisé le phénotype des macrophages.

Les populations cellulaires résidentes du foie sont nombreuses et variées et en ciblant certaines de ces populations avec un signal approprié, il est possible d'engendrer une forte réponse immunitaire rendant cet organe une cible particulièrement intéressante pour des stratégies d'immunothérapie qu'elles soient actives ou passives.

3-Immunothérapie du CHC

Plusieurs études *in vitro* ont permis d'isoler des lymphocytes T spécifiques du CHC et de les analyser afin d'identifier des médiateurs immunitaires spécifiques de la tumeur ainsi que des effecteurs non spécifiques avec une activité anti-tumorale. Ainsi, les lymphocytes infiltrants la tumeur (TIL) ont pu être isolés et amplifiés ce qui a permis d'identifier des lymphocytes T spécifiques de l'antigène MAGE parmi les TIL de patients atteints d'un CHC (Zerbini et al. 2004), ainsi que des lymphocytes T spécifiques de l'AFP (Butterfield et al. 2003). La présence de lymphocytes T dans la tumeur et le fait que le système immunitaire conserve

des lymphocytes T spécifiques d'un antigène du soi suggèrent qu'il est envisageable d'élaborer une stratégie d'immunothérapie pour traiter un CHC qu'elle soit passive ou active.

Les modèles animaux ont beaucoup aidé dans cet objectif surtout dans le cas de stratégie d'immunothérapie active spécifique d'un antigène. On peut citer notamment les travaux d'immunothérapie active dirigés contre l'AFP de Butterfield *et al*/ chez la souris transgénique pour HLA-A0201 qui ont permis l'identification de 4 peptides immunodominants de l'AFP humaine (AFPh) initialement générés par ordinateur pour la molécule HLA-A0201 (Butterfield et al. 2001) ainsi que les travaux de Tan qui montrent que l'injection de cellules dendritiques transduites à l'aide d'un adénovirus codant pour l'AFPh (Tan et al. 2006) ou de cet adénovirus seul en présence d'IFN γ (Tan and Zhu 2008) permet d'obtenir un effet thérapeutique contre la lignée Hepa 1.6 exprimant l'AFP. D'autres stratégies utilisant l'AFP murine (AFPm) ont conduit d'une part à l'observation d'une réponse immunitaire dirigée contre l'AFP lorsque des souris sont immunisées à l'aide d'un MVA recombinant (Virus de la vaccine Ankara modifié) codant pour l'AFPm (Tran et al. 2012), et d'autre part à un effet thérapeutique dans deux modèles précliniques murins : (i) dans un modèle orthotopique de CHC (Hepa1.6-AFPm) (Zhang et al. 2008) et (ii) dans le modèle DEN considéré comme le modèle de CHC préclinique murin le plus pertinent à l'heure actuelle (Cany et al. 2011a).

La majorité des essais cliniques d'immunothérapie réalisés chez l'homme ont été de type spécifique (**Tableau 1**), le but ayant été de stimuler une réponse immunitaire *in situ* par injection de cellules immunitaires autologues effectrices (TIL, LAK, CIK) ou présentatrices (DC chargées), ou encore de lysat tumoral ou de peptides. Les résultats les plus encourageants, à savoir augmentation du temps sans récurrence, diminution du risque de récurrence et augmentation de la survie globale, ont été obtenus lorsque les patients ont été immunisés avec un lysat tumoral autologue (Kuang et al. 2004; Peng et al. 2005). Il est important de noter que les patients inclus dans ces deux études ont un CHC de stade clinique précoce (patients stade III-IV exclus de l'étude).

Stratégie	Référence	Patients	Protocole	Réponse clinique
Non spécifique				
Chimiothérapie + IFN γ + IL-2	(Lygidakis et al. 1995)	20 patients stade III-IV	Injection trans-artérielle	14/20 taille tumeur diminuée
IFN γ + GM-CSF	(Reinisch et al. 2002)	15 patients stade III-IV inopérables	Injection sous-cutané	Pas d'augmentation de la survie
IL-12	(Sangro et al. 2004)	8 CHC de stade avancé	Adénovirus-IL12	6 patients stabilisés + 1 réponse partielle
Chimiothérapie + IFN α	(Vitale et al. 2007)	9 CHC de stade avancé	Injection artérielle intra-hépatique	3 réponses partielles sur 8 patients + 1 stabilisé
Spécifique passive				
Chimiothérapie +/- LAK	(Une et al. 1991)	12 patients par groupe	Adriamycine +/- LAK activés par l'IL-2	Moins de rechute dans le groupe ayant reçu les LAK
	(Kawata et al. 1995)	12 patients par groupe	Adriamycine +/- LAK activés par l'IL-2	Pas de différence statistique
Lymphocytes	(Takayama et al. 1991)	3 patients dont 2 métastasés	TIL (IL-2/ α CD3) + chimiothérapie	2 réponses partielles
	(Wang et al. 1997)	10 patients avec résection	TIL activés par IL-2 et surnageant culture LAK	Récurrence diminuée
	(Takayama et al. 2000)	150 patients randomisés	PBL + IL-2/ α CD3 i.v.	Amélioration survie globale, risque de récurrence diminué
CIK	(Hui et al. 2009)	127 patients randomisés	PBMC activés par IFN γ + IL-2 / α CD3 + IL1 α	Risque de récurrence diminué, pas d'augmentation de la survie globale
	(Pan et al. 2010)	41 patients traités par TACE et RFA	PBMC activés après RFA	Diminution du risque de récurrence
Spécifique active				
Cellules dendritiques	(Ladhams et al. 2002)	2 patients sans autre possibilité de traitement	DC activés à l'IL4 + GM-CSF chargées avec lysat tumoral autologue	Croissance tumorale diminuée chez un patient
	(Iwashita et al. 2003)	10 CHC non opérables	DC activés à l'IL4 + GM-CSF chargées avec lysat tumoral autologue	1 réponse mixte (1/2 tumeurs régressée chez 1 patient)
	(Lee et al. 2005)	31 CHC stade IV	DC chargé avec lysat tumoral autologue	Augmentation de la survie
	(Palmer et al. 2009)	35 CHC de stade avancé	DC chargées avec lysat lignée tumorale HepG2	1 réponse radiologique partielle
Tumeur autologue + cytokines	(Kuang et al. 2004)	41 patients	Tumeur autologue fixée + GM-CSF + IL2 + BCG	Augmentation du temps sans rechute, diminution du risque de récurrence et augmentation survie générale
	(Peng et al. 2005)	60 patients	Tumeur autologue fixée + GM-CSF + IL2 + BCG	Augmentation du temps sans rechute, diminution du risque de récurrence et augmentation survie générale
Peptides de l'AFP	(Butterfield et al. 2003)	6 patients stade IV	Peptides de l'AFP dans Montanide	Pas de réponse clinique
Cellules dendritiques chargées	(Butterfield et al. 2006)	10 patients stade III-IV	DC chargés avec peptides de l'AFP	Pas de réponse clinique
Peptides du GPC3	(Sawada et al. 2012)	33 CHC avancés	Peptides du GPC3 dans Montanide	19 patients stabilisés

Tableau 1 : Essais cliniques d'immunothérapie du CHC

Les résultats obtenus par ces stratégies d'immunothérapie bien que variables selon l'étude sont encourageants car ils montrent une diminution du risque de récurrence dans certains cas et dans le meilleur des cas une amélioration de la survie globale et/ou une régression tumorale alors que dans presque toutes ces études, les patients inclus présentent un stade avancé de la pathologie.

Partie 2 : Immunothérapie du carcinome hépatocellulaire à l'aide d'un anticorps anti-CD137

L'équilibre du système immunitaire nécessite des processus extrêmement contrôlés à chaque étape de la génération d'une réponse immunitaire. La superfamille des TNF (tumor necrosis family) récepteurs et leurs ligands sont des acteurs essentiels du contrôle de la survie ou de la mort des cellules immunitaires. Les lymphocytes T naïfs répondent à un antigène uniquement s'ils reçoivent des signaux co-stimulateurs fournis par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Le premier signal est fourni par la liaison du TCR (T cell receptor) du LT à la molécule de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)-peptide de la CPA, le second est fourni par la liaison du CD28 du LT au ligand B7 de la CPA. D'autres signaux interviennent par la suite pour déterminer la durée et l'intensité de l'activation T ainsi que l'homéostasie. Ces autres signaux peuvent être fournis par la liaison des cytokines à leur récepteur, et surtout par l'engagement des récepteurs de la superfamille des TNF récepteurs. Cet engagement peut influencer la réponse inflammatoire et la génération de la réponse innée (Melero et al. 1998b; Lee et al. 2009), l'organisation lymphoïde (Niu et al. 2007), l'activation des CPA (Josien et al. 2000), et influencer de manière directe la réponse T. Parmi les membres de la superfamille des TNF récepteurs, le CD137 apparaît être un médiateur important de la survie cellulaire surtout pour les LT CD8 (**Figure 7**).

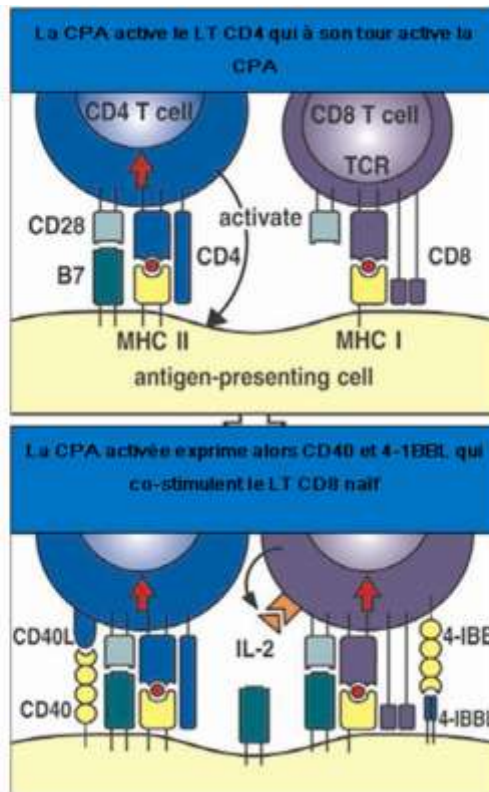


Figure 7 : Signaux nécessaires à l’activation d’un lymphocyte T (d’après (Charles Janeway 2006))

L’activation d’un lymphocyte T (LT) nécessite (i) une présentation du complexe CMH-peptide de la cellule présentatrice d’antigène (CPA) au TCR du LT et (ii) la liaison de B7 au CD28. Le lymphocyte ainsi activé exprime CD40L qui en se liant au CD40 de la CPA active complètement cette dernière. Elle exprime alors des molécules de co-stimulation telles que 4-1BBL (CD137L) qui en se liant au CD137 (4-1BB) du LT entraîne son activation prolongée et sa survie.

A : Expression du CD137 et de son ligand

Initialement, le CD137 a été identifié sur des lymphocytes T activés à la concanavaline A (Kwon et al. 1987). C’est une glycoprotéine de 30kDa de type I avec une séquence N-terminale extracellulaire qui existe sous forme de monomère et de dimère à la surface cellulaire. Le gène du CD137 murin s’étend sur environ 13kb du chromosome 4 chez la souris. Le gène du CD137 humain est présent sur le chromosome 1p36. La séquence nucléotidique du CD137 ne contient qu’un seul cadre ouvert de lecture qui conduit à la formation d’un polypeptide de 256 acides aminés. La séquence protéique humaine qui contient 255 acides aminés est à 60% homologue à celle de la souris. Dans la partie cytoplasmique de la protéine, cinq régions sont conservées entre l’homme et la souris, indiquant certainement un rôle important de ces résidus.

La séquence murine du ligand du CD137 (CD137L) se situe dans le chromosome 17 et se compose de 309 acides aminés alors que le CD137L humain se situe dans le chromosome 19p13 et contient 254 résidus. C'est une glycoprotéine de 24kDa de type II, sa séquence N-terminale est cytoplasmique. Chez la souris, le gène du CD137L se situe dans une région codant pour plusieurs molécules de la famille des TNF récepteurs (TNFR). Les séquences de l'homme et de la souris ont 36% d'homologie avec un domaine cytoplasmique plus long de 55 acides aminés chez la souris (Alderson et al. 1994). Chez les deux espèces, le domaine cytoplasmique contient une tyrosine conservée et une séquence consensus de phosphorylation par la caséine kinase I (CKI) qui est un domaine commun à plusieurs récepteurs au TNF (Watts et al. 1999).

1-Expression du CD137

In vitro, après une stimulation de lymphocytes T avec un anti-CD3, l'expression du CD137 est détectée dans les 3 heures suivant la stimulation (Kwon et al. 1987). Elle atteint un pic 48h après l'engagement du TCR du lymphocyte T, et ce de manière encore plus importante si le lymphocyte T reçoit le signal via son récepteur CD28, puis décline après 4-5 jours (Vinay and Kwon 1998; Cannons et al. 2001). *In vivo*, une analyse montre que l'expression du CD137 est plus précoce et plus transitoire que ce qui est observé *in vitro*. En effet, l'expression du CD137 est corrélée avec l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 et précède l'expression du marqueur tardif CD44 (Dawicki and Watts 2004). Il se peut que l'expression perdure dans des conditions particulières où l'antigène persiste comme durant un rejet de greffe de cœur où l'on retrouve des lymphocytes CD4 et CD8 activés exprimant le CD137 (Tan et al. 2000), durant une infection persistante par le virus de l'herpès (HSV-1) où la majorité des cellules CD3+ infiltrant la cornée expriment le CD137 (Seo et al. 2003), ou encore lors d'une infection sévère par le virus de la grippe (Lin et al. 2009). Ainsi, les effets des cellules activées par l'engagement du CD137 dépendent de son profil d'expression dans le modèle étudié. L'induction de l'expression du CD137 sur les lymphocytes T est dépendante d'un antigène sauf cas particulier comme l'étude de Pulle *et al* qui montre que l'expression du CD137 peut être induite sur des lymphocytes T CD8 mémoires en absence de l'antigène et en réponse à l'IL15 (Pulle et al. 2006).

Du fait de sa découverte sur des lymphocytes T activés, son expression a été longtemps restreinte à ce type cellulaire, aujourd'hui, il a été montré que de nombreux autres types

cellulaires l'expriment comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) (McHugh et al. 2002), les cellules dendritiques (DC) (Pauly et al. 2002), les monocytes (Langstein and Schwarz 1999), les mastocytes (Nishimoto et al. 2005), les éosinophiles (Heinisch et al. 2001), les neutrophiles (Heinisch et al. 2000), les NKT (natural killer T cells) activés (Kim et al. 2008), et les NK (natural killer) activés (Marvel and Walzer 2010). Les cellules dendritiques spléniques expriment constitutivement le CD137, et lorsqu'elles sont activées par leur récepteur CD40, son expression est diminuée. Plus récemment, une étude a montré que le CD137 pouvait être exprimé par des cellules d'origine non-hématopoïétique dans des conditions particulières. Celle-ci montre qu'une inflammation induit l'expression du CD137 dans les cellules endothéliales, ce qui entraîne le recrutement de monocytes sur le site inflammatoire (Drenkard et al. 2007).

2-Expression du CD137L

Le ligand du CD137, le CD137 ligand (CD137L ou 4-1BBL), est exprimé constitutivement par les cellules présentatrices d'antigènes et son expression est augmentée lorsqu'elles reçoivent leurs différents signaux d'activation. En effet, le lymphocyte B (LB) lorsqu'il est stimulé via CD40 et en présence d'un anticorps anti-IgM exprime fortement le CD137L après 48h de stimulation, il en est de même pour le macrophage lorsque celui-ci est activé par du LPS avec un pic d'expression à 24h. La DC quant à elle montre un pic d'expression du CD137L à 24h après stimulation par du LPS ou un anti-CD40 (Futagawa et al. 2002). Selon cette même étude, le lymphocyte B et le macrophage qu'ils soient activés ou non, n'expriment pas le CD137. De plus, les lymphocytes T qu'ils soient activés ou non n'expriment pas CD137L. Ainsi, l'activation des lymphocytes T via la signalisation CD137 proviendrait de l'interaction du récepteur CD137 des lymphocytes T activés et du CD137L des CPA activées. Dans des conditions pathologiques, d'autres types cellulaires non hématopoïétiques peuvent exprimer le CD137L tels que les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses (Saiki et al. 2008).

B : Voies de signalisation du CD137 et de son ligand

1-Signalisation du CD137

Plusieurs articles dans la littérature rapportent que les signaux engendrés par l'engagement du CD137, que ce soit par la liaison d'anticorps agonistes ou par la surexpression de son ligand, augmentent l'activation et la survie des lymphocytes T (DeBenedette et al. 1995; Hurtado et al. 1997; Shuford et al. 1997). La transduction du signal du CD137 est relayée par les facteurs associés aux récepteurs au TNF (TRAF), famille de protéines qui active NF κ B et les voies de survie cellulaire via AP-1 (Chung et al. 2002). Le processus d'activation de la voie des récepteurs au TNF est bien décrit. La trimérisation du récepteur à la surface cellulaire entraîne le recrutement d'un trimère de protéines TRAF qui se lie à un domaine cytoplasmique conservé du TNFR appelé domaine de liaison au TRAF. Les protéines TRAF recrutées sont différentes selon le récepteur de la famille des TNFR auquel elles se lient. Lors de son engagement, le récepteur CD137 s'associe à TRAF1 et TRAF2 conduisant à l'activation de NF κ B, de la protéine kinase de régulation du signal extracellulaire (ERK), de la protéine kinase c-Jun N-terminal (JNK), et de la cascade de signalisation incluant les protéines kinases p38 activées par des agents mitogènes (MAP kinases) (Arch and Thompson 1998; Jang et al. 1998; Saoulli et al. 1998; Cannons et al. 2000; Sabbagh et al. 2008) (**Figure 8**).

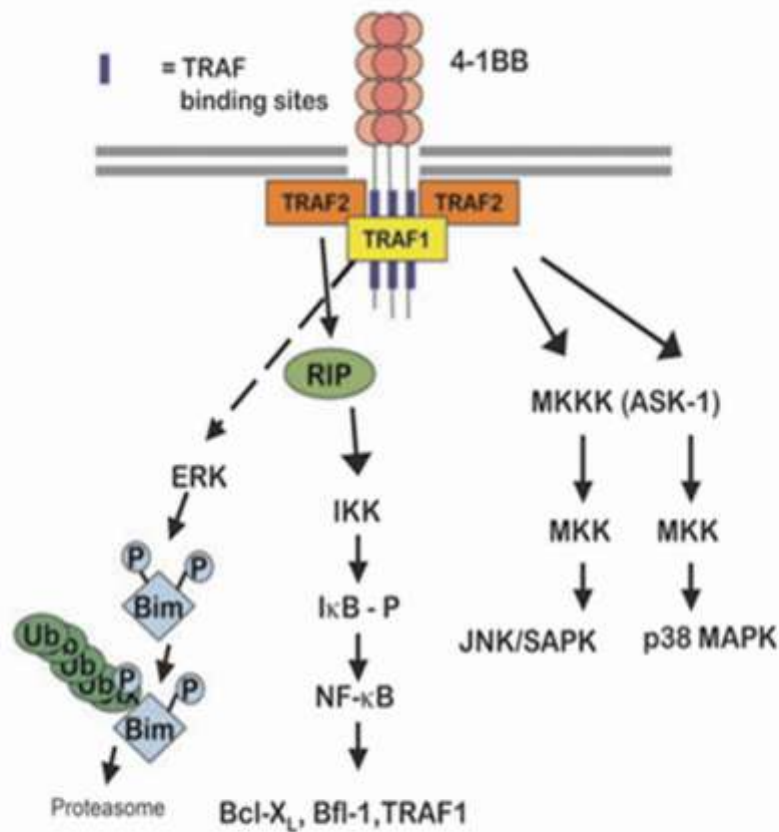


Figure 8 : Transduction du signal du CD137 dans un lymphocyte T (d'après (Wang et al. 2009))

Lorsque le CD137 du lymphocyte T se lie à son ligand, les protéines TRAF1 et TRAF2 sont recrutées, conduisant à l'activation du facteur de transcription NFκB et à l'activation des signaux de transduction médiés par la kinase ERK, par la kinase JNK et par la cascade de signalisation des MAP kinases. La voie de signalisation ERK dépend de TRAF1 alors que les voies de signalisation des MAP kinases et de JNK sont initiées par TRAF2.

Cela a été démontré notamment lors d'expériences de double hybride chez la levure qui ont révélé la présence de deux sites de liaison aux protéines TRAF sur le domaine cytoplasmique du CD137 qui permettent le recrutement direct de TRAF1 et TRAF2 (Arch and Thompson 1998). Une autre protéine TRAF a été décrite comme pouvant se lier au CD137 (TRAF3) mais seulement chez l'homme (Jang et al. 1998). Cela conduit à la survie du lymphocyte et à la détermination de son comportement fonctionnel selon la somme des autres signaux co-stimulateurs.

2-Signalisation inverse du CD137L

L'engagement du CD137L est capable de générer un « signal inverse » c'est-à-dire que le ligand est capable de réagir comme un récepteur en générant un signal de transduction.

Le système de double hybride chez la levure a permis d'identifier le CD137L comme un partenaire direct de la signalisation du TLR4 chez le macrophage. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que lorsque le TLR4 était stimulé par le lipopolysaccharide (LPS), il fixait la protéine adaptatrice MyD88 dans la première heure, ce qui aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que NF κ B, AP-1, puis à la production précoce de TNF α et à la production du CD137L. La fixation du CD137L sur le TLR intervient dans un second temps, 2 à 8 heures après la stimulation du TLR4 avec le LPS. Cela conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que CREB et C/EBP qui contrôlent la production de TNF α à un stade plus tardif (Kang et al. 2007). Dans cette étude, les souris déficientes en CD137L perdent leur capacité à induire l'expression tardive de TNF α et sont protégées de la mort induite par le LPS.

Une étude chez la souris montre que l'engagement du CD137L sur des macrophages avec la protéine fusionnée CD137-Fc entraîne la sécrétion et l'activation de plusieurs molécules qui jouent un rôle dans la viabilité cellulaire et la sécrétion de cytokines. Des tests d'inhibition à l'aide d'agents pharmacologiques révèlent que ceci serait dû à l'activation de différentes protéines de signalisation telles que des membres de la famille src, les protéines Akt, mTOR (Kim et al. 2009).

C : Fonction du CD137 ou du CD137L

1-Chez la souris

La liaison du CD137 à la surface des lymphocytes T CD4 permet d'augmenter leur prolifération cellulaire (Gramaglia et al. 2000). La fixation du CD137L sur le CD137 à la surface d'un lymphocyte T peut stimuler la production des cytokines de type Th1 comme de type Th2 selon le stimulus utilisé, sans jouer de rôle particulier dans le niveau d'expression des cytokines ou sur le profil cytokinique, il aurait plutôt un rôle dans le nombre de cellules

sécrétant ces cytokines (Chu et al. 1997; Gramaglia et al. 2000). *In vitro*, la protéine recombinante CD137L est capable d'activer les lymphocytes CD8 et CD4, alors que les anticorps monoclonaux anti-CD137 montrent une activation préférentielle des lymphocytes T CD8 (Shuford et al. 1997).

Dans certaines situations, le signal du CD137L/CD137 peut remplacer le signal B7/CD28 pour activer le lymphocyte T. En effet, les lymphocytes T isolés à partir de souris déficientes en CD28 sont capables de proliférer et de produire des cytokines en réponse à un anti-CD3 et en présence de la protéine recombinante CD137L (Saoulli et al. 1998), et ces souris CD28^{-/-} voient leur réponse antivirale contre le virus *influenza* restaurée lorsqu'elles sont traitées avec un anticorps agoniste anti-CD137 (Halstead et al. 2002). Ceci n'est possible que si la stimulation antigénique via l'engagement du TCR est forte et dans ce cas les niveaux d'IL2 sécrétées sont similaires à une stimulation par le CD28. A l'inverse si le signal du TCR est faible, la stimulation du CD137 ne remplace pas l'interaction B7/CD28, ce qui est cohérent avec son rôle physiologique qui suit une stimulation du CD28 (Saoulli et al. 1998).

Bien que le CD137L permette aux lymphocytes T de proliférer et de produire de l'IL2 en se liant à son récepteur, l'effet majeur de la stimulation du CD137 semble être de réguler la survie des lymphocytes T. L'engagement du CD137 inhibe la mort programmée des lymphocytes T (Hurtado et al. 1997), et l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 *in vivo* prolonge la survie des lymphocytes T activés, avec les meilleurs effets observés sur les CD8 (Takahashi et al. 1999). Cet effet du CD137 sur l'inhibition du signal de mort semble être dépendant de NF κ B qui induit l'expression de Bcl-X_L et de Bfl-1 qui sont deux molécules de la famille anti-apoptotique Bcl-2 (Lee et al. 2002).

Les souris déficientes pour le CD137 ou le CD137L ont joué un rôle prépondérant dans la compréhension de la fonction du signal CD137L/CD137. Plusieurs équipes ont montré un rôle très important de ce signal dans la génération d'une réponse mémoire et dans la survie des lymphocytes T CD8 lors d'un rechallenge viral (Bertram et al. 2002), et dans ce cas l'expression du CD137 sur les lymphocytes T CD8 mémoires qui est responsable de leur survie serait induite par l'IL15 (Pulle et al. 2006), ou pendant une infection virale persistante (Bertram et al. 2002; Lin et al. 2009). Ces souris ont également été utilisées pour étudier la réponse immunitaire antibactérienne et selon la souche bactérienne étudiée, le CD137L est nécessaire pour induire une réponse de type humorale (Moens et al. 2007) ou de type cellulaire (Shedlock et al. 2003).

Le rôle de la voie CD137/CD137L dans l'activation des cellules T mémoires sans autre stimulus est confirmé dans une autre étude où l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 aussi bien que la surexpression du CD137L chez la souris entraîne une expansion des lymphocytes T mémoires (Zhu et al. 2007).

L'engagement du CD137 sur ces cellules dendritiques entraîne l'expression d'interleukine (IL)-6 et d'IL-12 (Futagawa et al. 2002) alors que sur les NK, *in vitro* cela conduit à l'expression d'interféron (IFN)- γ et à l'augmentation de leur prolifération et *in vivo* leur activation par un anticorps agoniste anti-CD137 permet d'augmenter la réponse cytotoxique des lymphocytes cytotoxiques (CTL) (Wilcox et al. 2002b).

2-Chez l'homme

Comme c'est le cas chez la souris, la stimulation du CD137 chez l'homme agit sur les lymphocytes T CD4 et CD8 (Wen et al. 2002). Dans un premier temps, le CD137 humain a été identifié comme ayant un rôle dans l'augmentation des cytokines de type Th1. En 1998, Kim *et al*/montrent que les PBMC humains stimulés lorsqu'ils sont mis en présence d'un anti-CD137 sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires de type IFN γ , TNF α , et inhibent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Kim et al. 1998). C'est également le cas dans une étude de 2004 qui montre que des monocytes transduits à l'aide d'un adénovirus codant pour le CD137L augmentent la sécrétion de cytokines, la prolifération, et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 mémoires et que ce mécanisme passerait par l'augmentation de l'expression de molécules effectrices telles que la perforine, le granzyme A (Bukczynski et al. 2004). D'autres types cellulaires tels que les cellules du sang de cordon peuvent être aussi stimulées via le CD137 par la liaison du CD137L à son récepteur ou par des anticorps agonistes anti-CD137 de façon dépendante de l'antigène, ce qui conduit à l'augmentation de leur cytotoxicité et au nombre de CD8 effecteurs (Kim et al. 2002; Laderach et al. 2002). Chez l'homme, la stimulation par le CD137 semblerait contrôler la fonctionnalité des lymphocytes T, alors que chez la souris, le CD137 agit plutôt sur le nombre de cellules effectrices (Bukczynski et al. 2004). Dans les deux espèces, la stimulation de la voie CD137/CD137L conduit à une augmentation de la survie des lymphocytes T avec un acteur commun qui est le Bcl-X_L (Laderach et al. 2002; Lee et al. 2002).

Les cellules dendritiques humaines expriment à leur surface le CD137L, de manière plus importante lorsqu'elles reçoivent les signaux de co-stimulation appropriés (CD40 + IL-1 β). Lorsque le CD137L est engagé à leur surface par le CD137-Fc, en plus du CD40, les cellules dendritiques produisent plus d'IL-12 (Laderach et al. 2003), ou de TNF α (Lippert et al. 2008). L'engagement de ce ligand conduit également à un « signal inverse » dans les lymphocytes B qui expriment cette molécule. Ce signal aboutit à une forte prolifération des lymphocytes B et une augmentation de la sécrétion d'IgM (Pauly et al. 2002). C'est également le cas pour les monocytes où la liaison du CD137L entraîne la sécrétion d'IL-8, d'IL-6, et de TNF α , régule l'expression de certains récepteurs de surface, et permet la survie de ces cellules (Langstein et al. 1998; Langstein and Schwarz 1999).

D : Thérapies utilisant la voie CD137/CD137L

En raison de l'expression du CD137 et de son ligand par une multitude de types cellulaires (**Figure 9**), les thérapies mettant en jeu ces deux molécules sont nombreuses et diffèrent dans leur mode d'action.

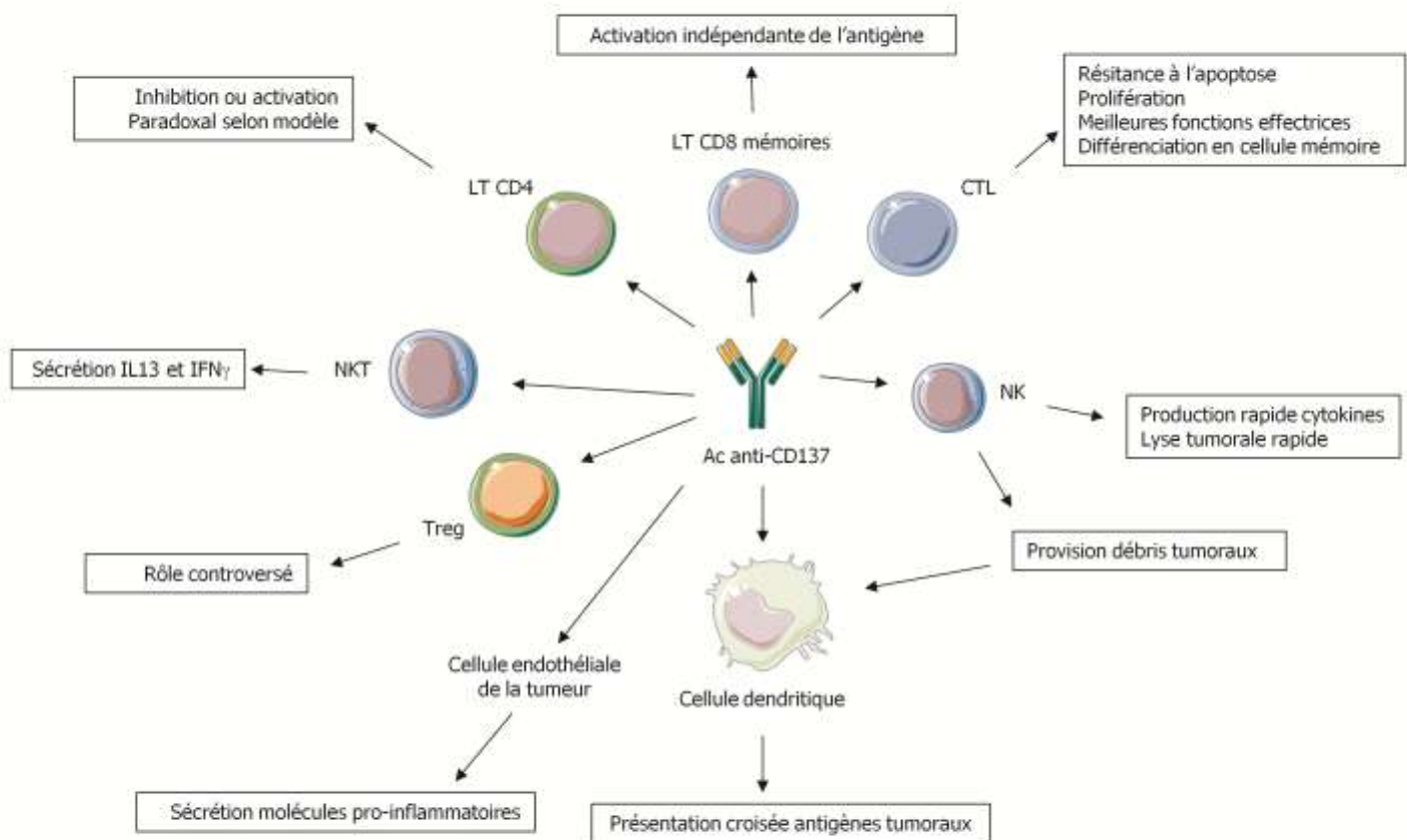


Figure 9 : Médiateurs cellulaires possibles de l'effet thérapeutique de l'anticorps anti-CD137 (d'après (Melero et al. 2008))

Les anticorps monoclonaux agonistes anti-CD137 agissent sur de multiples types cellulaires, fournissant ainsi un panel d'actions différentes qui conduisent à la réponse immunitaire anti-tumorale. Il est convenu que l'effet anti-tumoral principal serait la conséquence de la liaison de l'anticorps agoniste anti-CD137 sur les CTL activés mais que le rôle des autres cellules ciblées par cet anticorps est à prendre en compte dans l'élimination de la tumeur, notamment les NK.

1-Immunité antivirale et antibactérienne

La propriété d'activation de la voie CD137/CD137L chez les lymphocytes T a été explorée dans des essais précliniques dirigés contre différents microorganismes pathogènes (**Tableau 2**).

Pathogène	Traitement	Résultats observés	Référence
Virus de l'immunodéficience simienne	ADN-Gag + anti-CD137	Meilleure réponse des CD8, augmentation expression IFN γ et granzyme B	(Calarota et al. 2008)
	ADN-Gag-Pol-Env + anti-CD137	Meilleure réponse des CD8, augmentation expression IFN γ , 2/6 macaques n'ont plus de virus détecté dans le sérum	(Hirao et al. 2011)
Influenza	Anti-CD137	Plus large réponse des CD8 et plus forte réponse cytotoxique observée	(Halstead et al. 2002)
	Anti-CD137	100% souris survivent (quand α CD137 injecté à j+1)	(Zhang et al. 2007)
Virus de la chorioméningite lymphocytaire	Anti-CD137	Plus de virus détecté dans le sérum des souris 100j post-infection (quand α CD137 injecté à j+3)	(Zhang et al. 2007)
	Anti-CD137 + anti-PD1	Effet synergique des anticorps, diminution charge virale, augmentation expression IFN γ	(Vezys et al. 2011)
Virus de l'hépatite C	Ad-NS3 +anti-CD137	Amélioration de la réponse anti-virale cytotoxique et auxiliaire	(Arribillaga et al. 2005)
Virus de l'immunodéficience humaine	Virus variole codant pour protéines VIH et CD137L	Forte réponse CD8, réponse mémoire détectable encore deux mois post immunisation	(Harrison et al. 2006)
	ADN-Gag + anti-CD137 ou ADN-CD137L	Forte augmentation de la réponse anti-virale avec plus de LT CD4 et CD8 sécrétant IFN γ (+ réponse humorale activée quand ADN-CD137L)	(Ganguly et al. 2010)
	ARNm CD137L + ARNm Gag dans DC	Augmentation de la réponse CD8, de leur survie, de leur sécrétion de cytokines et de leur fonctionnalité	(De Keersmaecker et al. 2011)
Streptococcus pneumoniae	Anti-CD137	Inhibition de la réponse humorale dirigée contre l'antigène protéique mais pas contre l'antigène polysaccharidique	(Wu et al. 2003)

Tableau 2 : Essais précliniques dans des modèles d'infections virale et bactérienne

Ces différentes études montrent un rôle très important de la stimulation de cette voie dans l'activation des lymphocytes T CD8, que ce soit à l'aide d'un anticorps anti-CD137 comme dans l'étude de Halstead *et al*/ où une plus large réponse des lymphocytes T CD8 et des CTL dirigés contre le virus de la grippe chez la souris est observée (Halstead et al. 2002), ou que ce soit par expression du CD137L comme dans l'étude de Harrison *et al*/ où une plus forte réponse des lymphocytes T CD8 est observée lorsque le virus recombinant de la variole code pour les protéines du VIH et également pour le CD137L, en plus d'une réponse mémoire forte détectable encore deux mois après l'immunisation (Harrison et al. 2006).

Chez le macaque, l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 en plus d'une immunisation contre la protéine simienne Gag induit une meilleure réponse lymphocytaire CD8 spécifique de Gag avec une augmentation de l'expression d'IFN γ et de granzyme B (Calarota et al. 2008) et permet d'éradiquer totalement le virus chez 2/6 animaux (Hirao et al. 2011).

L'électroporation de cellules dendritiques récupérées à partir de PBMC de patients atteints du SIDA avec des ARNm codant pour Gag du VIH et pour le CD137L permet une activation plus efficace des lymphocytes T CD8 spécifiques de Gag et une augmentation de leur survie (De Keersmaecker et al. 2011).

Il est important de noter qu'une étude montre que l'effet thérapeutique observé est dépendant du temps où l'injection du traitement est pratiquée et donc qu'en fonction de l'environnement pro-inflammatoire, de l'organisme pathogène et de l'avancement de la réponse immunitaire, l'activation du CD137 peut entraîner une orientation de la réponse très différente (Zhang et al. 2007).

2-Tolérance médiée par le CD137 et auto-immunité

Les effets du signal du CD137 ne sont pas limités aux pathologies infectieuses. En effet, des études conduites sur la transplantation ont montré que la stimulation de la voie du CD137 par injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 pouvait conduire à l'exacerbation de la maladie, comme lors du rejet du greffon par les lymphocytes alloréactifs du receveur que ce soit pour une allogreffe intestinale ou pour une greffe de cœur (Shuford et al. 1997; Wang et al. 2003), ou lors de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Blazar et al. 2001). Dans certains cas, seuls les lymphocytes T CD8 du donneur ou du receveur selon le type de rejet, semblent jouer un rôle dans la réponse alloréactive, dans d'autres cas, les lymphocytes T CD4 en plus des lymphocytes T CD8 rejettent le greffon. L'étude de Nozawa *et al*/ va dans ce sens pour la détérioration de la GVHD chronique mais pas pour la GVHD aiguë, une amélioration de la maladie a été observée lorsque la voie du CD137 est inhibée par injection d'un anticorps anti-CD137L (Nozawa et al. 2001). L'étude de Wang *et al*/ montre que l'injection d'un anticorps antagoniste anti-CD137 (CD137-Ig) conduit à l'inhibition du rejet de l'allogreffe intestinale (Wang et al. 2003). Seulement une étude plus récente a montré que l'injection d'un anticorps monoclonal anti-CD137 (3H3) entraînait l'inhibition de la GVHD chronique (Kim et al. 2005). Ce paradoxe illustre la complexité de la voie du CD137, où dans un cas la stimulation peut

apporter une amélioration de la pathologie et dans d'autres l'empirer. Toutefois, il existe des explications pour ce paradoxe comme le fait que la stimulation du CD137 peut entraîner une tolérance immunitaire dans certaines situations.

La première preuve de concept de tolérance immunitaire suite à l'injection d'un anticorps monoclonal anti-CD137 a été démontrée par Mittler *et al*/ qui montrent une inhibition de la réponse humorale allogénique lorsqu'ils injectent *in vivo* un anticorps agoniste anti-CD137 chez des souris injectées avec des globules rouges de mouton (Mittler et al. 1999). Cette inhibition passerait par une anergie des lymphocytes T CD4, plus particulièrement par une délétion des CD4 induite par le signal de mort programmé (Kim et al. 2005).

Le traitement de maladies auto-immunes à l'aide d'un anticorps anti-CD137 donne également des résultats paradoxaux. En effet, l'injection d'un anticorps agoniste monoclonal anti-CD137 réduit l'incidence et la sévérité de l'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris (Sun et al. 2002a; Sun et al. 2002b), inhibe le lupus érythémateux systémique (Foell et al. 2003), et l'arthrite rhumatoïde (Seo et al. 2004), mais augmente la sévérité du diabète chez la souris non-obèse diabétique (NOD) (Sytwu et al. 2003). Les mécanismes de suppression de la réponse décrits dans ces études montrent essentiellement une délétion des lymphocytes T CD4 médiée par le CD137 directement, en sur-activant les cellules et conduisant à leur mort programmée. D'autres études laissent à penser que la délétion des CD4 pourrait passer par d'autres mécanismes dépendants des lymphocytes T régulateurs CD4 (Zheng et al. 2004) ou des Treg CD8 (Myers et al. 2003).

La complexité de l'utilisation d'un anticorps agoniste anti-CD137 est mesurable par les effets différents qu'il peut produire selon le modèle utilisé (**Figure 10**) et la pathologie à traiter.

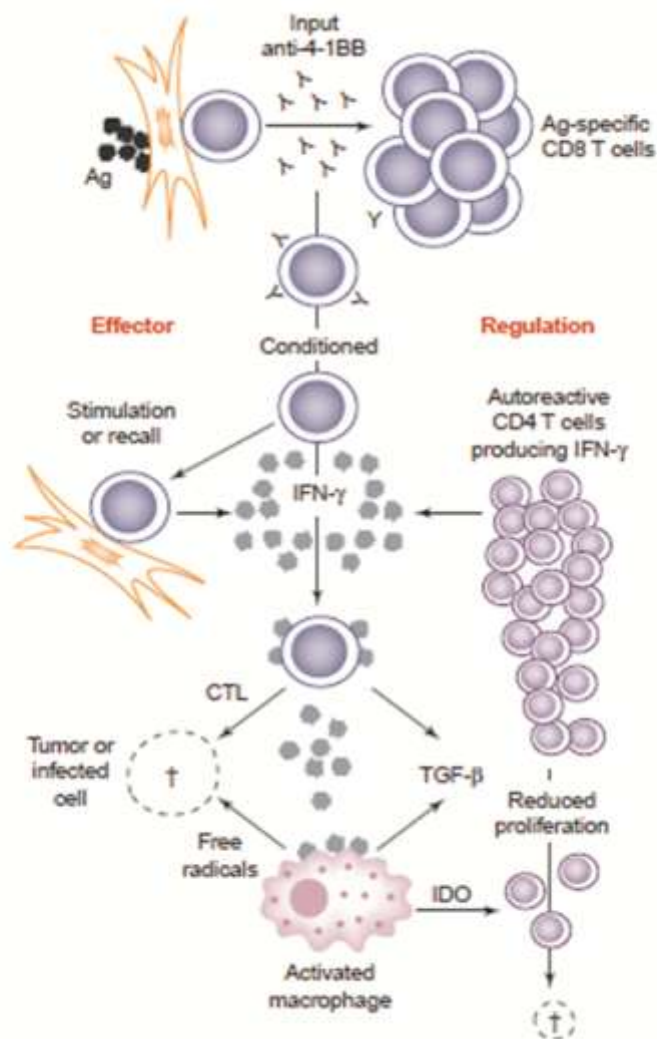


Figure 10 : Exemple du rôle paradoxal d'un anticorps anti-CD137 (d'après (Myers and Vella 2005))

La cellule dendritique (en jaune) présente l'antigène au lymphocyte T CD8 (en bleu). La présence d'un anticorps agoniste anti-CD137 renforce la co-stimulation et le lymphocyte T CD8 devient effecteur (illustré sur la partie gauche de la figure) ou régulateur (partie droite de la figure). Après reconnaissance antigénique, les lymphocytes T CD8 sécrètent de l'IFN γ . C'est le cas également des lymphocytes T CD4 (en violet) autoréactifs. Les LT CD8 activés lient l'IFN γ , tuent leurs cellules cibles, ou inhibent la prolifération des CD4 par la sécrétion de TGF β dans le cas d'auto-immunité. En parallèle, les macrophages activés par l'IFN γ tuent les cellules tumorales ou infectées, ou suppriment la réponse auto-immune par sécrétion d'indoléamine ou de TGF β .

3-Immunothérapie des cancers

Dans les essais précliniques d'immunothérapie du cancer, le traitement ciblant la voie CD137/CD137L a largement été utilisé sous forme d'anticorps monoclonaux agonistes du CD137 seuls ou combinés (**Tableau 3**). La plupart des autres formes associées au CD137 et au CD137L comme la protéine recombinante du CD137 (CD137-Fc), l'anticorps antagoniste du CD137 (CD137-Ig), ou la protéine recombinante CD137L ont surtout été utilisées comme outils dans la compréhension du mécanisme de la voie CD137/CD137L.

3.1 : Anticorps monoclonaux anti-CD137

Le potentiel anti-tumoral des anticorps anti-CD137 a été mis en évidence pour la première fois lors d'études d'immunothérapie contre la lignée tumorale Ag104A, sarcome très peu immunogène et contre la lignée P815, mastocytome très immunogène. L'injection d'un anticorps anti-CD137 chez des souris ayant ces tumeurs permet la diminution de manière significative du développement tumoral avec pour acteur principal les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Melero et al. 1997). Dans une étude postérieure, les auteurs se sont intéressés au rôle que pouvaient tenir les cellules NK dans cet effet. Ils montrent que la déplétion des cellules NK1.1+ abroge l'effet thérapeutique de l'anti-CD137 sur la lignée P815 mais que le rôle des NK ne peut pas être un rôle direct cytotoxique car la lignée P815 est connue pour être peu sensible à la lyse médiée par les cellules NK *in vitro* (Melero et al. 1998b). Selon Miller *et al*, cet effet serait médié par l'IFN γ et le CD40 (Miller et al. 2002)

L'effet thérapeutique des anticorps anti-CD137 dépend de la lignée tumorale mais également de la voie d'injection de la tumeur. En effet, lorsque la lignée de fibrosarcome MCA205 est injectée en sous-cutané ou en intraveineuse, l'effet thérapeutique des anticorps anti-CD137 est limité voire inexistant alors que lorsque ces cellules et les cellules de gliome GL261 sont injectées en intracrânial, la survie des souris traitées augmente et le développement tumoral est diminué suggérant une importance du site d'injection et de la réponse inflammatoire conséquente (Kim et al. 2001). Il a été montré que lorsqu'il n'y avait pas d'effet thérapeutique d'un anticorps agoniste anti-CD137 sur les lignées peu immunogènes, le mécanisme mis en jeu est une ignorance des lymphocytes T envers la tumeur et non une anergie. L'injection d'un peptide immunodominant en plus d'un anticorps agoniste anti-CD137 suffit à lever l'ignorance (Wilcox et al. 2002a).

Traitement	Caractéristique du traitement	Lignées tumorales	Médiateurs cellulaires	Effet observé	Référence
Ac anti-CD137	2*300µg (j+4 et j+7)	P815 mastocytome, Ag104A sarcome	Lymphocytes T CD4 et CD8	Eradication tumeur, augmentation activité cytolytique lymphocytaire	(Melero et al. 1997)
	2*300µg (j+4 et j+7)	P815 mastocytome	Cellules NK	Pas effet direct NK car P815 résistante à la lyse des NK, mais effet indirect notable	(Melero et al. 1998b)
	2*100µg (j+3 et j+6)	MCA205 fibrosarcome, GL21 gliome	Lymphocytes T CD4 et CD8	Effet thérapeutique observé uniquement quand lignées injectées en intracrâniale	(Kim et al. 2001)
	2*100µg (j+7 et j+10) + pept dans IFA	C3, TC-1 carcinomes pulmonaires	Lymphocytes T cytotoxiques	Effet thérapeutique sur 42 à 86% des souris; rôle inhibiteur des lymphocytes T CD4	(Wilcox et al. 2002a)
	4*100µg (j+4, j+6, j+24, et j+31 post tsft adoptif) + tsft CD8 spéc Ag P1A	J558 plasmocytome	Lymphocytes T cytotoxiques	Augmentation du rejet tumoral, croissance tumorale retardée, augmentation de la survie et du nombre de LT CD8 spécifiques	(May et al. 2002)
	2*100µg (j+4 et j+7)	HOPC, NSO myélomes	Lymphocytes T CD8 et NK	Augmentation de la survie et du rejet tumorale; rôle de l'IFN γ	(Murillo et al. 2008)
	4*100µg (j0, j+8, j+11, et j+14)	MC38 carcinome colon	Infiltrats lymphocytes T CD8	Pas d'effet thérapeutique	(Dubrot et al. 2010)
Variants de l'anti-CD137	Transfert adoptif lymphocytes T activés anti-CD137 in vitro	MCA205 fibrosarcome	Non étudié	Augmentation de la survie et du rejet tumorale; rôle de l'IFN γ ; expression IL-10 diminuée	(Li et al. 2003)
	Lignées exprimant partie Fv de l'anti-CD137	K1735 mélanome	Lymphocytes T CD4 et NK	Rejet du challenge tumoral avec lignée sauvage, induction réponse mémoire	(Ye et al. 2002)
Thérapies combinées	2*100µg (j+9 et j+11) + tsft DC autologues transduites par un Ad-IL12	MC38 carcinome colon	Non étudié	100% souris rejettent la tumeur; augmentation expression IFN γ	(Tirapu et al. 2004)
	3*200µg (j+14, j+21, et j+28) anti-CD137 et 3*800µg anti-CTLA-4 (même temps)	MC38 carcinome colon	Lymphocytes T CD8 uniquement	1/8 souris seulement développe une tumeur; pas de rôle des LT CD4 et des NK	(Kocak et al. 2006)
	2*50µg anti-CD137 (j+8 et j+10) + Ad-IL12	MCA26 carcinome colon	Lymphocytes T CD8 et NK	100% souris survivent quand dose Ad-IL12 forte, effet synergique des deux traitements sur RI innée et adaptative	(Chen et al. 2000)
	1*150µg anti-CD137 (j+6) + Ac déplétant les Treg (anti-FR4)	A20 lymphome	Lymphocytes T CD8 et NK	100% souris survivent quand les Treg sont déplétés	(Houot et al. 2009)
	3*100µg (j+8, j+11, et j+14) DC chargées avec lysat tumoral	B16 mélanome, MCA205 fibrosarcome	Lymphocytes T CD4 et CD8 et NK	Prolongation de la survie, diminution du développement tumoral, diminution du risque de récurrence	(Ito et al. 2004)
	4*100µg (j+7, j+10, j+14, et j+17) + chimiothérapie	Renca carcinome rénal	Non étudié	70% des souris rejettent complètement la tumeur, rejet rapide du rechallenge	(Ju et al. 2008)
	5*100µg (tous les 5 jours) + cyclophosphamide	B16 mélanome	Lymphocytes T CD8 et NK	Augmentation de la survie, augmentation du nombre de souris sans tumeur; rôle des CD8+/CD11c+	(Kim et al. 2009)
	3*100µg (j+8, j+15, et j+22) + radiothérapie	EMT6 cancer sein	Non étudié	Retard de la croissance tumorale	(Shi and Siemann 2006)

CD137L et ses variants	Ad-CD137L + Ad-IL12 intratumoral	JC Métastases du foie	Lymphocytes T CD4	78% de survie; diminution de la croissance tumorale, augmentation du nombre de souris sans tumeur	(Martinet et al. 2002)
	Ad-CD137L + transfert adoptif LAK	Cholangiosarcome	Non étudié	Inhibition de la croissance tumorale; rôle de l'IL2, de l'IFN γ , et du GM-CSF	(Yoshida et al. 2003)
	Lignées exprimant CD137L +/- B7	P815 mastocytome, Ag104A sarcome	Lymphocytes T cytotoxiques	P815-CD137L rejeté chez 92% souris ; Ag104A-CD137L/B7 rejeté chez 60% souris	(Melero et al. 1998a)
	Lignée transfectée avec plasmide codant CD137L	AGN2a neuroblastome	Lymphocytes T cytotoxiques	Augmentation de la survie, jusqu'à 100% de survie avec challenge tumoral de faible densité	(Yan et al. 2004)
	Lignée transfectée avec plasmide codant CD137L	MCF carcinome estomac	Lymphocytes T cytotoxiques	Augmentation de la survie; diminution de la croissance tumorale, forte réponse Th1	(Li et al. 2008)
	Lignée transfectée avec plasmide codant CD137L + anti-CTLA-4	RM1 cancer prostate	Lymphocytes T cytotoxiques	80% de survie	(Youlin et al. 2012)

Tableau 3 : Principaux essais précliniques d'immunothérapie anti-cancer utilisant la voie CD137/CD137L

La majorité des données dans la littérature montre un rôle important des lymphocytes T CD8 dans l'effet thérapeutique des anticorps agonistes anti-CD137. D'autres cellules sont capables d'intervenir dans l'effet thérapeutique observé comme les cellules endothéliales de la tumeur qui expriment le CD137 et qui lorsqu'elles sont stimulées par un anticorps agoniste anti-CD137, surexpriment des molécules d'adhésion permettant ainsi l'augmentation de la migration des lymphocytes T dans la tumeur (Palazon et al. 2011).

D'autres études ont utilisé la propriété des anticorps anti-CD137 à réduire le signal de mort programmé des lymphocytes T pour réaliser des transferts adoptifs. Une des contraintes du transfert adoptif de lymphocytes T est de générer une quantité suffisante de cellules à injecter. Les conditions de culture *ex vivo* conduisent souvent à la mort des lymphocytes par l'action du signal de mort programmé et à la perte de molécules de co-stimulation, et par conséquent, à une diminution de la persistance de ces cellules *in vivo* (June 2007). Ces conditions de culture conduisent à la perte des molécules CD27 et CD28 sur les lymphocytes T infiltrants la tumeur mais conduisent à l'apparition de l'expression du CD137. La stimulation de ces cellules par un anticorps agoniste anti-CD137 inhibe significativement le signal de mort programmé, augmente la division cellulaire, et amplifie l'activité cytotoxique des lymphocytes

contre la tumeur (Hernandez-Chacon et al. 2011). *In vivo*, l'injection de lymphocytes T de ganglions drainants la tumeur ayant été amplifiés et activés par un anti-CD137 *ex vivo* conduit à une diminution significative du nombre de métastases pulmonaires (Li et al. 2003).

3.2 : Immunothérapies combinées avec un anti-CD137

Plusieurs études ont montré que la combinaison d'anticorps monoclonaux anti-CD137 avec d'autres agents anticancéreux pouvait augmenter la réponse anti-tumorale. Ainsi avec une lignée tumorale peu immunogène comme la lignée de mélanome B16F10, le traitement combiné d'un anticorps anti-CD137 avec l'IL12 permet d'obtenir une régression tumorale chez 50% des souris et un taux de survie augmenté alors qu'aucun des traitements seul n'est efficace (Xu et al. 2004). La combinaison IL12/CD137 a aussi donné de bons résultats contre la lignée de carcinome du côlon MC38 (Tirapu et al. 2004). Un effet thérapeutique contre cette lignée a aussi été observé lorsque l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 est combinée avec l'injection d'un anticorps anti-CTLA-4 (Kocak et al. 2006). Une équipe a observé 100% de survie des souris dans un modèle de lymphome lorsqu'ils combinaient un anticorps anti-CD137 à une déplétion des lymphocytes T régulateurs (Houot et al. 2009).

La combinaison de l'injection d'un anti-CD137 avec des traitements plus conventionnels comme la radiothérapie ou la chimiothérapie ont montré de bons résultats. Lorsqu'un anticorps anti-CD137 est combiné avec de la radiothérapie, on observe une augmentation de l'activité anti-tumorale dirigée contre la lignée de cancer du sein EMT6 (Shi and Siemann 2006), et lorsqu'il est combiné avec la chimiothérapie, jusqu'à 70% des animaux n'ont pas de tumeur établie dans un modèle de carcinome rénal (Ju et al. 2008).

3.3 : Immunothérapies anti-tumorales à l'aide d'un anti-CD137 dans le foie

Quelques essais d'immunothérapie contre des tumeurs implantées dans le foie à l'aide d'un anticorps agoniste anti-CD137 ont été réalisés. Tous les modèles utilisés sont des modèles de métastases de tumeurs non hépatiques implantées dans le foie. Dans un modèle de carcinome de côlon métastatique implanté dans le foie (lignée MCA26), la thérapie combinée d'un anti-CD137 et de l'IL-12 conduit à une régression tumorale de la tumeur hépatique et des métastases pulmonaires chez tous les animaux double-traités de façon

dépendante des lymphocytes T CD8 et des NK (Chen et al. 2000). Dans le même type de modèle mais avec la lignée CT26, l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 à faible dose ($3 \times 20 \mu\text{g}$) en combinaison avec l'injection de cellules dendritiques chargées avec du lysat tumoral permet d'obtenir un effet thérapeutique similaire à celui obtenu lors de l'injection d'un anti-CD137 à plus forte dose ($3 \times 100 \mu\text{g}$) seul sans toxicité associée (Lee et al. 2011). Lorsque c'est une lignée de cancer du sein qui est injectée dans le foie, 60% des animaux survivent lorsqu'ils reçoivent un anticorps agoniste anti-CD137, et 87% survivent lorsque ce traitement est couplé avec une injection d'adénovirus codant pour l'IL-12 en intratumoral (Martinet et al. 2002). Une étude plus récente montre que l'injection d'un anticorps anti-CD137, bien qu'augmentant l'infiltration lymphocytaire dans le foie, ne permet pas d'obtenir un effet thérapeutique supérieur dans le foie contre la lignée MC38 que celui observé lorsque la lignée est injectée en sous-cutané (Dubrot et al. 2010).

Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une réponse immunitaire anti-tumorale dans le foie bien que cet organe soit associé à un environnement plutôt tolérogène.

3.4 : Autres traitements dérivés du CD137

En plus des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD137, d'autres traitements utilisant cette voie du CD137/CD137L ont donné des résultats prometteurs. Le but de faire exprimer le CD137L à des cellules tumorales est d'induire une meilleure vaccination afin d'éliminer plus efficacement la tumeur. Ainsi des souris vaccinées avec la lignée de mastocytome P815 ou de sarcome Ag104A exprimant le CD137L (+B7 pour le sarcome) sont protégées contre la lignée sauvage et développent une immunité à long-terme (Melero et al. 1998a). Des souris qui ont reçu un adénovirus codant pour le ligand du CD137 en intratumoral dans un modèle de métastases hépatiques de cancer du sein présentent une régression tumorale importante. Lorsque ce traitement est combiné à un adénovirus codant pour l'IL12, il y a jusqu'à 78% de survie des souris (Martinet et al. 2002).

Comme décrit dans le paragraphe 3.1, pour réaliser un transfert adoptif, il est nécessaire d'obtenir une activation efficace des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux pour pouvoir les ré-infuser au patient et générer un effet thérapeutique mesurable. La capacité de stimulation du système CD137/CD137L peut également être utilisée en faisant exprimer le CD137L à des cellules présentatrices d'antigènes *ex vivo*. De cette façon, les

lymphocytes T cytotoxiques voient leur survie augmentée avec un maintien du répertoire de clones T CD8 ce qui n'est pas le cas lorsque les lymphocytes sont stimulés par le protocole standard CD3/CD28 (Maus et al. 2002). Dans des travaux postérieurs, cette même équipe a montré qu'avec ce système, les lymphocytes T CD8 issus de ganglions lymphatiques de patients atteints de mélanome proliféraient de manière plus importante qu'avec le protocole standard, avec une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes de mélanome (Sluijter et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de la voie CD137/CD137L dans le traitement du cancer. De ce fait, le ciblage de la voie du CD137 permet l'élimination de tumeurs bien établies et le fait que la combinaison de la thérapie d'un anti-CD137 agit de façon synergique avec d'autres agents anticancéreux et/ou la radiothérapie pour éliminer des tumeurs dites peu immunogènes rendent ce traitement d'autant plus prometteur. Ces résultats ont incité à l'utilisation d'un anticorps anti-CD137 dans plusieurs essais cliniques.

3.5 : Essais cliniques

Plusieurs essais cliniques de tumeurs solides ont été engagés avec pour traitement un anticorps anti-CD137. Par exemple, l'anticorps anti-CD137 entièrement humanisé BMS-663513 a été utilisé dans des essais cliniques de phase I et II pour traiter des patients atteints de mélanome, de carcinome rénal ou de cancer des ovaires. Bien qu'ils ne soient pas encore publiés, les premiers résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que cette thérapie est plutôt bien tolérée lorsque la dose d'anticorps injectée est faible (0,3 mg/kg toutes les trois semaines). La recherche de biomarqueurs a révélé une expression importante des gènes induits par les interférons de type I dans le sang périphérique et dans les biopsies post-traitement des patients ayant reçu cet anticorps. Des études de pharmacocinétiques du sang ont montré une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 au jour 8 post-traitement, cependant ce résultat ne corrèle pas avec un résultat clinique (Molckovsky and Siu 2008). Une réponse thérapeutique partielle a été observée seulement chez 6% des patients atteints de mélanome bien que 17% de ces patients et 14% des patients atteints de carcinome rénal présentent une stabilité de la maladie de 6 mois ou plus. Cependant, 6 à 15% des patients ont développé des effets secondaires indésirables lorsque la dose du traitement est maximale (15

mg/kg toutes les trois semaines) tels qu'une forte neutropénie, diarrhées, fièvre, fatigue, et augmentation des transaminases hépatiques (Sznol et al. 2008). Un nouvel essai clinique de phase I avec cet anticorps est en cours de recrutement pour tester la sûreté, la tolérance, et la pharmacocinétique de ce traitement chez des patients atteints de différentes tumeurs solides (NCT01471210-clinicaltrials.gov).

E : Résultats

Comme nous l'avons vu dans cette première partie, le CHC est un cancer qui survient sur un foie pathologique dans la majorité des cas. Son diagnostic est souvent tardif et bien que la résection chirurgicale et la transplantation permettent de traiter efficacement le CHC, la majorité des patients ne sont pas éligibles à ces traitements et ils ne limitent pas la récurrence qui survient dans 70% des cas à 5 ans. L'immunothérapie n'est actuellement pas un traitement reconnu du CHC, les essais cliniques conduits avec ce type de thérapie sont donc surtout réalisés sur des patients qui présentent un stade avancé du CHC et qui n'ont plus d'autres choix de traitement. Malgré cela, les résultats obtenus encouragent l'utilisation de l'immunothérapie comme choix de traitement du CHC, surtout pour limiter le risque de récurrence.

Plusieurs stratégies d'immunothérapie sont possibles, de type spécifique qui permet la génération d'une réponse immunitaire mémoire ou de type non-spécifique par injection de cytokines par exemple. Cette dernière stratégie a donné des résultats paradoxaux et a laissé place à des stratégies d'immunothérapie spécifique notamment grâce à une meilleure compréhension des acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale (Butterfield 2007). Ces dernières années, l'immunothérapie passive non-spécifique connaît un nouvel intérêt grâce à la découverte de récepteurs modulateurs de la réponse anti-tumorale qui peuvent être la cible d'anticorps monoclonaux agonistes ou antagonistes.

Les essais précliniques sont indispensables pour comprendre la mise en place de la réponse anti-tumorale et de confirmer ou d'infirmer l'efficacité théorique du traitement envisagé pour un cancer donné. Dans notre laboratoire, nous disposons de plusieurs modèles précliniques murins de CHC. D'abord, un modèle de CHC orthotopique où la lignée d'hépatome murin Hepa 1.6 est injectée dans la veine porte. Cette injection conduit à l'envahissement du parenchyme hépatique par les cellules tumorales en trois semaines. Ce modèle présente l'avantage d'être rapide tout en étant plus pertinent qu'un modèle ectopique puisque la tumeur est localisée dans l'organe dont elle est issue. Ce modèle permet donc d'étudier l'efficacité d'un traitement et les mécanismes associés *in situ*. Ensuite, un modèle chimiquement induit par un agent carcinogène, le modèle DEN. Dans ce modèle, l'injection de diéthylnitrosamine (DEN) à 50µg/g à des souriceaux de 15 jours conduit au développement de CHC sous forme de nodules isolés visibles à partir de 6 mois post-injection. Ce modèle est

contraignant à cause du temps nécessaire au développement tumoral mais c'est le modèle préclinique de CHC le plus pertinent car il présente une grande similarité avec la pathologie humaine. En effet, les CHC du modèle DEN possèdent des caractéristiques anatomo-pathologiques identiques au CHC humains, ré-expriment l'antigène oncofœtal AFP (Cany et al. 2011a) et présentent également des caractéristiques moléculaires similaires avec une corrélation de la survie à certains gènes commune (Chew et al. 2010; Schneider et al. 2012).

Du fait de la ré-expression de l'AFP dans le modèle DEN et de l'introduction de l'AFP par un vecteur viral dans la lignée Hepa 1.6, ces deux modèles ont déjà été évalués dans des stratégies d'immunothérapie active spécifique de l'AFP (Zhang et al. 2008; McIlroy et al. 2009; Cany et al. 2011a). Seulement, ce n'est pas le seul antigène associé à la tumeur ré-exprimé par la tumeur. On peut penser que l'activation non-spécifique des lymphocytes présents dans la tumeur ciblerait plus d'antigènes et par conséquent augmenterait l'activité anti-tumorale.

Les anticorps monoclonaux, outils de l'immunothérapie passive non-spécifique, ont donné de bons résultats sur différents modèles de cancer que ce soit des anticorps agonistes ou antagonistes (Melero et al. 2008). Les anticorps agonistes anti-CD137 sont des anticorps activateurs du système immunitaire. Ils ciblent le CD137 qui est un récepteur de la superfamille des récepteurs au TNF. Ils permettent l'amplification de l'activation des lymphocytes T, et de prolonger leur survie, améliorant ainsi la réponse anti-tumorale. Des lymphocytes T exprimant le récepteur CD137 ont été trouvés au sein de la tumeur de patients atteints de carcinome hépatocellulaire suggérant une amplification possible de la réponse anti-tumorale préexistante (Wan et al. 2004).

Nous avons donc testé le potentiel thérapeutique d'un anticorps monoclonal agoniste anti-CD137 sur nos deux modèles murins précliniques de CHC en se basant sur deux critères, d'une part sur la diminution du développement tumoral dans les deux modèles, et d'autre part sur la survie des animaux dans le modèle orthotopique. Nous avons ensuite identifié les effecteurs et mécanismes mis en jeu dans la réponse anti-tumorale en combinant des expériences de déplétion et de transfert adoptif *in vivo* et en étudiant la variation des populations cellulaires immunitaires du foie et en systémique *ex vivo* à différents temps.

Les résultats sont présentés dans l'article suivant.

F : Discussion

Nous avons montré que l'injection d'un anticorps agoniste anti-CD137 induisait un effet thérapeutique significatif sur nos deux modèles précliniques de CHC et qu'elle générerait une réponse mémoire à long terme et très robuste au point d'être transposable par transfert adoptif. Nous avons montré sur le modèle orthotopique que cet effet était majoritairement dû aux lymphocytes T CD8 et aux cellules NK. Bien que les cellules NK aient un rôle dans l'effet anti-tumoral observé, leur nombre est diminué dans les souris traitées avec l'anticorps anti-CD137. Cette observation peut s'expliquer par la régulation négative du renouvellement des NK de manière dépendante de l'expression importante d'IFN γ lors de l'injection d'un anti-CD137 (Choi et al. 2010). L'effet anti-tumoral des NK activés par un anticorps anti-CD137 résiderait principalement dans leur cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC) (Houot et al. 2012).

Nous avons observé que le traitement par l'anti-CD137 du modèle orthotopique induisait un effet thérapeutique partiel et nous avons identifié deux populations inhibitrices présentes chez des souris non-répondeuses au traitement pouvant avoir un rôle dans la modulation de la réponse anti-tumorale médiée par l'anticorps anti-CD137 : les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces deux populations cellulaires ont d'ores et déjà été caractérisées comme des populations suppressives de la réponse anti-tumorale dans différents cancers (Berezhnaya 2010). Nous avons observé une inhibition localisée dans la tumeur des lymphocytes T CD8 chez la moitié des souris à un temps précoce dans le développement tumoral (j9) suggérant un mécanisme inhibiteur de la réponse anti-tumorale. Ceci est en complet accord avec la présence d'une proportion plus importante de lymphocytes T CD8 et une faible fréquence de MDSC et Treg dans les souris répondeuses comparé aux souris non-répondeuses à un temps plus tardif dans le développement tumoral (j14). Dans le but d'identifier le mécanisme suppressif des MDSC, nous avons amplifié l'expression de gènes par RT-qPCR et observé une expression relative de l'arginase-1 diminuée dans les souris répondeuses, enzyme sécrété par les MDSC qui inhibe les lymphocytes T CD8 (Rodriguez et al. 2004).

Nous avons également observé la présence de macrophages dans la tumeur uniquement chez les souris traitées à un temps précoce du développement tumoral (j9) et uniquement chez les souris répondeuses à un temps plus tardif (j14). Il existe deux types de

macrophage, les macrophages M2 considérés comme pro-tumoraux et les macrophages M1 considérés comme anti-tumoraux. Dans le CHC, la présence de macrophages M1 dépendante de la chimiokine CCL2 est associée à un bon pronostic de la survie globale (Marukawa et al. 2012). Nous avons trouvé une expression relative de CCL2 augmentée dans le foie des souris répondeuses. De plus, nous avons trouvé une corrélation positive entre la fréquence élevée de macrophages ainsi que de la forte expression d'IL-6 (cytokine sécrétée par les macrophages, activatrice des cellules immunes) dans le foie à un temps précoce (j9) et la survie globale des souris traitées. On peut donc raisonnablement penser que l'injection d'un anticorps anti-CD137 dans notre modèle orthotopique entraîne l'infiltration de la tumeur par des macrophages de type M1 qui aident à la génération d'une réponse anti-tumorale efficace. Afin de distinguer les macrophages M2 des macrophages M1, les marquages immunohistochimiques de l'arginase-1 et de NOS2 sont en cours dans notre laboratoire (Redente et al. 2009).

Nos résultats montrent que la stimulation de la voie CD137/CD137L par un anticorps agoniste anti-CD137 pour traiter le carcinome hépatocellulaire et surtout limiter le risque de récurrence est envisageable. L'effet thérapeutique de l'anti-CD137 pourrait être augmenté par la déplétion de cellules immunosuppressives comme les MDSC et les Treg conduisant ainsi à la régression tumorale et à la génération d'une réponse anti-tumorale suffisamment forte pour limiter le risque de récurrence. Dans ce but, nous avons évalué l'efficacité de traitements combinés sur nos deux modèles de CHC. L'efficacité de la déplétion des Treg par injection d'un anticorps anti-CD25 (PC61) avait précédemment été démontrée dans le modèle orthotopique (Cany et al. 2011b) et dans le modèle DEN (données non publiées). Nous avons émis l'hypothèse que la combinaison d'un anticorps agoniste anti-CD137 et d'un anticorps déplétant anti-CD25 pouvait avoir un effet synergique sur la réponse anti-tumorale dans nos deux modèles de CHC. Nous avons émis la même hypothèse pour la combinaison d'un anticorps agoniste anti-CD137 et d'un anticorps déplétant anti-Gr1 (anti-Ly6G/Ly6C) qui cible les MDSC. Les résultats obtenus ne sont pas présentés ici car nous n'avons plus observé l'effet thérapeutique de l'anticorps anti-CD137 dans aucune des quatre expériences différentes (orthotopique : PC61 + 3H3 ; orthotopique : anti-Gr1 + 3H3 ; DEN : PC61+ 3H3 ; DEN : anti-Gr1 + 3H3). Il s'est avéré que dans toutes ces expériences, nous avons utilisé le même lot d'anticorps anti-CD137 qui était différent des expériences précédentes. Un test de comparaison d'efficacité des différents lots a été réalisé *in vitro* et a confirmé la perte d'efficacité du lot utilisé dans ces quatre expériences. Ces expériences nous ont tout de même

permis de confirmer que la déplétion des Treg dans les deux modèles de CHC conduisait à une diminution de la surface tumorale et du nombre d'animaux ayant un CHC.

Nous avons trouvé que la déplétion des MDSC par injection d'un anticorps anti-Gr1 a entraîné la survie d'un tiers des souris (2/6) dans le modèle orthotopique suggérant un rôle de ces cellules dans ce modèle et donc la possibilité d'obtenir un effet synergique du traitement combiné anticorps anti-CD137 + anticorps anti-Gr1. Les résultats dans le modèle DEN sont plus controversés. Nous n'avons pas observé de diminution de la surface tumorale chez les souris déplétées à l'aide de l'anticorps anti-Gr1 par rapport aux souris contrôles, seulement nous n'avons pas observé de déplétion des MDSC dans les PBMC de ces souris et ce que ce soit 5 jours ou 24 heures post-injection de l'anticorps anti-Gr1. Il semble que l'anticorps déplétant anti-Gr1 (clone RB6-8C5) n'ait aucune efficacité chez le modèle DEN. Nous ne pouvons donc pas exclure un rôle des MDSC dans la modulation de la réponse anti-tumorale chez le modèle DEN. Il existe d'autres agents inhibiteurs des MDSC comme la gemcitabine (Suzuki et al. 2005) ou encore le 5-fluorouracile (Vincent et al. 2010). Il serait intéressant de tester ces traitements en combinaison avec l'anticorps anti-CD137 dans nos deux modèles de CHC.

Ces approches sont d'autant plus rationnelles que les approches d'immunothérapie actuelles vont de plus en plus vers des traitements combinés. La combinaison d'anticorps agoniste anti-CD137 avec des anticorps déplétants de populations immunosuppressives ou d'une chimiothérapie ciblant les MDSC est donc très prometteuse. De plus, les thérapies ciblant les CHC de stade avancé combinent le sorafénib, seul traitement systémique ayant augmenté la survie de patients atteints d'un CHC avancé, avec d'autres traitements. Sur cette idée, nous sommes en train de tester l'efficacité de la combinaison d'un anticorps anti-CD137 avec le sorafénib sur notre modèle de CHC orthotopique.

Le CHC se développant dans la plupart des cas sur un foie pathologique, l'injection d'un anticorps anti-CD137 offre la possibilité de traiter non seulement le CHC mais également la pathologie sous-jacente. Par exemple, dans le cas des hépatites virales qui compliquent la majeure partie des cas de CHC, la stimulation de la voie CD137/CD137L en plus de l'inhibition de PD-1 sur des LT intrahépatiques de patients infectés par le VHB ou sur des LT périphériques de patients infectés par le VHC entraîne l'activation de lymphocytes T spécifiques des virus (Fisicaro et al. 2012).

Il est toutefois important de noter l'hépatotoxicité liée à l'injection d'anticorps agoniste anti-CD137 à forte dose (cinq injections ou plus à 3mg/kg) que ce soit chez la souris dans un but thérapeutique (Wang et al. 2010) ou non (Niu et al. 2007), ou chez l'homme (NCT00612664). L'ajustement de la dose d'anticorps à injecter est donc nécessaire, un nouvel essai clinique de tolérance et d'acceptabilité est à ce titre ouvert (NCT01471210) (0,03 à 0,3mg/kg). La plupart des études utilisant un anticorps agoniste anti-CD137 font deux injections à 3mg/kg à quelques jours d'intervalle y compris la nôtre, et elles ne rapportent pas d'hépatotoxicité liée à l'utilisation d'un anticorps anti-CD137. L'utilisation de doses plus faibles apparaît donc sûre et reste efficace comme dans l'étude de Chen *et al* qui montre que l'injection d'un anticorps anti-CD137 à 1,5mg/kg combinée à un autre traitement permet la survie de tous les animaux challengés (Chen et al. 2000).

Nos résultats mettent en évidence l'efficacité thérapeutique d'un anticorps anti-CD137 et soutiennent l'utilisation d'un anticorps anti-CD137 dans les essais cliniques pour les patients atteints de CHC.

Partie 3 : AAV : facteur d'initiation du CHC ?

A : Généralités

Les maladies génétiques sont restées longtemps sans traitement adapté. Il a fallu attendre le 20ème siècle pour voir avancer le diagnostic de ces pathologies, notamment grâce à la meilleure connaissance du génome et de son fonctionnement. Ainsi, l'identification progressive de gènes impliqués dans le déclenchement ou la transmission de maladies héréditaires a permis de fournir un diagnostic fiable et une meilleure compréhension de l'installation de la pathologie.

Les maladies génétiques sont dues à un défaut de fonctionnement d'un gène à cause de mutations qui engendrent une protéine instable qui ne remplit plus sa fonction. Le meilleur traitement consiste donc à remplacer ce gène déficient. La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention de ces maladies qui utilise les acides nucléiques comme médicament. Elle consiste au transfert d'une information génétique dans certaines cellules du patient afin de corriger le gène endogène déficient. Dans ce but, différents vecteurs viraux et non-viraux ont vu le jour. Les vecteurs non-viraux présentent l'avantage d'être faiblement immunogènes et de ne pas limiter la taille du transgène mais les résultats *in vivo* sont décevants. Les efforts se sont donc nettement concentrés sur l'adaptation de vecteurs viraux car ils présentent l'avantage d'être très variés avec des modes d'infection différents, des tropismes différents, et transduisent efficacement de nombreux types cellulaires (**Figure 11**).

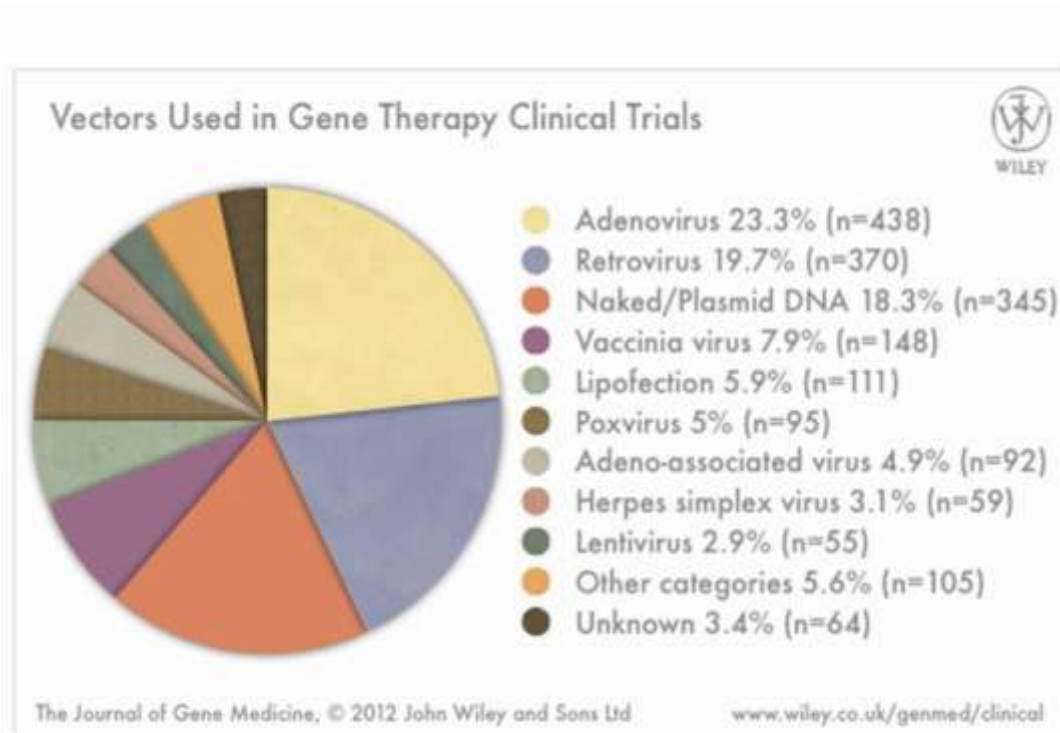


Figure 11 : Vecteurs utilisés en thérapie génique (d'après <http://www.wiley.com/genmed/clinical>)

Plusieurs vecteurs viraux et non viraux sont utilisés en thérapie génique dans le traitement de maladies génétiques et du cancer avec une majorité d'essais cliniques utilisant l'adénovirus. L'AAV est le 7^{ème} vecteur le plus utilisé.

Comme de l'ADN étranger ne peut pas rester librement dans une cellule en division, il n'est pas traité par la machinerie de réplication de l'ADN de l'hôte, son expression est donc perdue au cours des divisions cellulaires. Des vecteurs intégratifs ont alors été créés afin d'apporter le gène thérapeutique dans le génome de la cellule hôte et ainsi permettre une expression à long terme de la protéine. D'autre part, des vecteurs non-intégratifs ont été conçus surtout pour être utilisés dans la transduction de cellules quiescentes car dans des cellules en division, leur matériel génétique est perdu au fur et à mesure des cycles de division.

L'utilisation des vecteurs viraux en thérapie génique ont nécessité de réaliser de grosses modifications dans le génome viral. En effet, les gènes de réplication virale, quelque soit le virus utilisé, ont été supprimés. Les vecteurs ainsi devenus non réplcatifs sont appelés virus recombinants. Trois types de vecteurs viraux sont majoritairement utilisés en thérapie génique

dans le traitement de maladies génétiques, il s'agit des rétrovirus (dont les lentivirus), des adénovirus, et des virus adéno-associés (AAV).

Les vecteurs dérivés des rétrovirus sont des vecteurs à ARN simple brin, qui s'intègrent dans le génome cellulaire de la cellule cible après une étape de rétro-transcription. Certains types de rétrovirus sont capables de transduire efficacement des cellules quiescentes, et sont intégratifs permettant ainsi l'expression à long-terme du transgène dans la cellule hôte.

Les vecteurs dérivés des adénovirus sont également capables de transduire efficacement les cellules quiescentes. Ils ont l'avantage de permettre l'expression de transgènes de grande taille en raison de leur grande capacité d'encapsulation (30kb). Cependant, les protéines virales de l'adénovirus sont très immunogènes et l'élimination rapide des cellules transduites par le système immunitaire de l'hôte conduit à une expression très transitoire du transgène. La production de vecteurs adénoviraux sans aucune protéine du virus dans le génome viral a permis de réduire ce problème et donc de prolonger l'expression du transgène (Alba et al. 2005).

Les vecteurs dérivés des AAV sont des vecteurs à ADN, initialement simple brin, aujourd'hui pouvant être double brin (AAVsc pour self-complementary). Ces vecteurs sont bien tolérés et ne sont associés à aucune pathologie humaine. Ils possèdent une faible capacité d'encapsulation mais de nombreux sérotypes existent, ce qui leur donne l'avantage de transduire un très grand nombre de types cellulaires différents. Ils subsistent dans la cellule hôte majoritairement sous forme épisomale.

Un des premiers essais cliniques réalisés chez l'homme pour corriger un gène déficient a utilisé un rétrovirus comme vecteur de gène. Le but a été de remplacer le gène muté de la sous-unité gamma commune à différents récepteurs de cytokines dans des cellules d'origine hématopoïétique *ex vivo*, puis de ré-injecter ces cellules autologues au patient pour traiter le syndrome d'immunodéficience combinée sévère liée à l'X (SCID-X1) (Hacein-Bey-Abina et al. 2008). Les résultats étaient très encourageants puisque 9 des 10 patients traités voyaient leur système immunitaire restauré. Cependant, 4 de ces 9 patients ont développé une leucémie 2 à 6 ans plus tard. Une chimiothérapie a permis d'éradiquer la leucémie chez 3 patients mais le dernier est décédé. A posteriori, l'identification des sites d'intégration du vecteur rétroviral a permis de comprendre l'origine de la leucémie. En effet, chez deux des patients, l'intégration du vecteur dans les cellules a eu lieu à proximité de proto-oncogènes conduisant à l'expression aberrante de protéines délétères avec comme conséquence extrême la mort d'un patient. A

partir de ces résultats, la recherche s'est concentrée à utiliser des vecteurs modifiés dans le but d'avoir le moins d'effets secondaires possible. Ainsi, les transgènes ont été mis sous le contrôle de promoteurs spécifiques (et non plus viraux), mutés pour ne plus exprimer d'intégrase (Vargas et al. 2004), et l'AAV est devenu un vecteur viral très attractif car il demeure majoritairement sous une forme épisomale et les événements intégratifs sont très rares (Nakai et al. 2001).

Plusieurs maladies génétiques sont candidates à la thérapie génique. On distingue deux sortes de maladies génétiques : les maladies monogéniques et les maladies multifactorielles. Les maladies monogéniques sont dues à la mutation d'un seul gène. On estime aujourd'hui qu'il en existe près de 6 000 : près d'un enfant sur 100 naît avec une maladie génétique inscrite dans son génome. Beaucoup de ces maladies sont désormais connues du grand public comme la mucoviscidose, les myopathies, la chorée de Huntington, l'anémie falciforme... Les maladies multifactorielles sont plus complexes, mais beaucoup plus répandues : elles sont dues à l'association de plusieurs gènes et à des facteurs environnementaux.

Dans le foie, il existe différentes maladies génétiques qui peuvent être traitées par la thérapie génique, comme les hémophilies, l'hypercholestérolémie familiale, les mucopolysaccharidoses, la maladie de Wilson on encore, la maladie de Crigler-Najjar. La plupart de ces maladies sont monogéniques et donc leur traitement consiste à apporter une copie saine du gène déficient dans les hépatocytes, le but souhaité étant d'obtenir une expression à un niveau thérapeutique à long terme. L'AAV a été utilisé comme vecteur dans plusieurs de ces maladies et à donner d'excellents résultats, ce qui a entraîné son utilisation en clinique. De ce fait, plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours avec ce vecteur.

B : Les virus adéno-associés (AAV)

1-Structure de l'AAV

L'AAV est un virus non-enveloppé de la famille des Parvoviridae. Il est dépendant de la présence d'un virus auxiliaire pour se répliquer (le plus fréquent étant l'adénovirus). Il n'est associé à aucune pathologie chez l'homme. Il est composé d'une capside et d'un génome ADN simple brin flanqué de deux séquences terminales répétées inversées (ITR). Les ITR sont des structures secondaires palindromiques en épingle à cheveux de 145 paires de bases qui sont

indispensables en *cis* pour la réplication et l'encapsidation des virions (Snyder et al. 1993). L'AAV a été découvert initialement comme contaminant de production adénovirales (Atchison et al. 1965). On dénombre aujourd'hui 12 sérotypes différents d'AAV dont 9 bien caractérisés (Gao et al. 2004). Chaque sérotype est associé à un tropisme donné. En effet, la nature des protéines présentes à la surface des capsides des différents AAV déterminera les interactions possibles avec les récepteurs et co-récepteurs membranaires présents à la surface des cellules cibles.

2-Infection cellulaire par l'AAV

Les mécanismes d'infection, de réplication et d'intégration ont été essentiellement décrits pour le sérotype 2. L'AAV pénètre dans un organisme hôte par endocytose. Une fois dans le cytoplasme, la particule virale se dirige vers le noyau où elle est décapsidée. L'ADN simple brin est alors converti en molécule double brin et entre dans une phase de latence ou une phase de réplication dépendante de la présence d'un virus auxiliaire. Durant la phase de latence, l'AAV peut persister sous une forme épisomale ou sous une forme intégrée. En présence d'un virus auxiliaire, par exemple l'adénovirus, l'AAV entre en cycle réplicatif et produit alors de nouvelles particules virales.

La transduction d'une cellule par un AAV recombinant se réalise de la même façon qu'un virus sauvage, c'est-à-dire que l'AAV recombinant est endocyté puis le génome viral est transloqué au noyau après décapsidation où il persistera sous forme épisomale ou intégrative sans production de particules virales puisqu'il est délété des gènes de réplication (**Figure 12**).

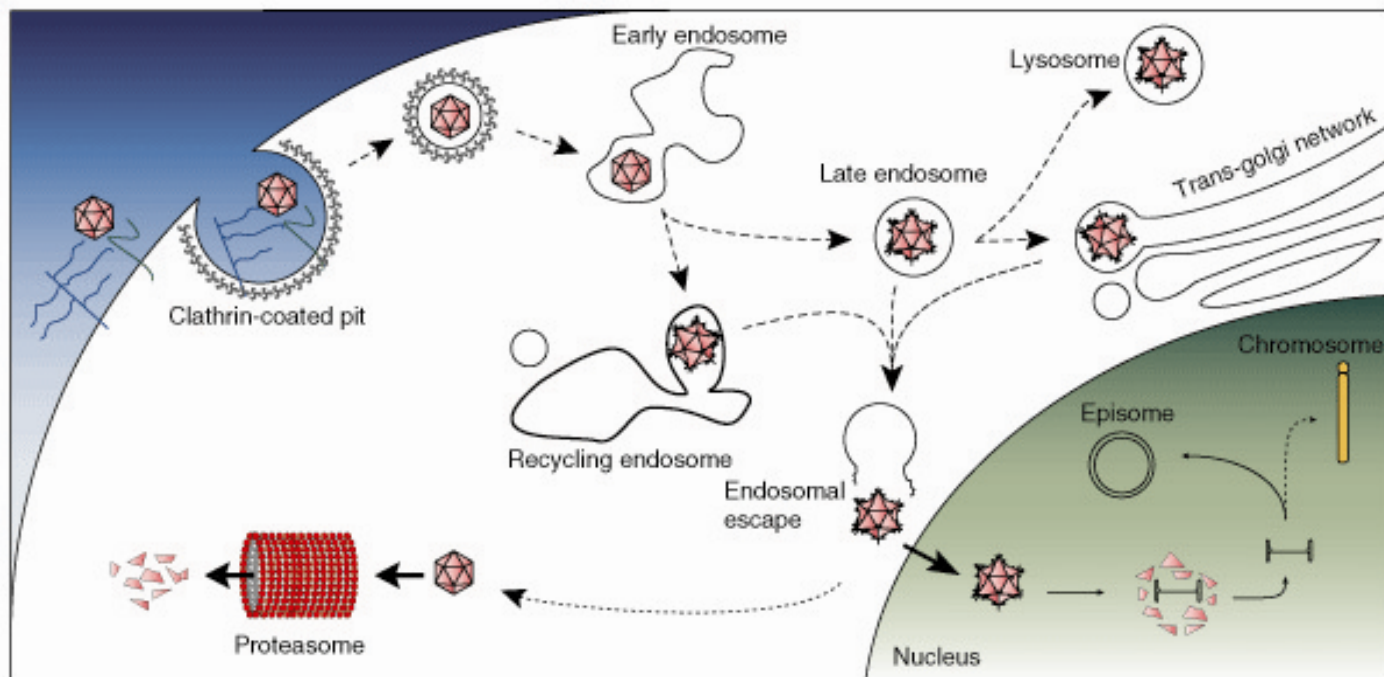


Figure 12 : Entrée cellulaire et trafic d'un AAV recombinant (d'après (Schultz and Chamberlain 2008))

L'AAV recombinant pénètre dans la cellule hôte par endocytose. Le transport de la particule jusqu'au noyau se réalise de différentes façons dont certaines représentées dans ce schéma. Le traitement des particules dans l'endosome conduit à la dénaturation des protéines de la capsid, à la libération des particules dans le cytoplasme et à leur transport vers le noyau. La décapsidation du virus se produit probablement dans le noyau où le génome viral est alors libéré et peut former des épisomes ou plus rarement s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

Plusieurs études ont montré que la persistance de l'AAV et donc de l'expression du transgène serait due majoritairement à une circularisation du génome en monomères ou concatémères épisomaux (**Figure 13**). La concatémérisation consiste en une fusion de plusieurs molécules d'ADN AAVr double brin en conformation "tête-à-tête" ou tête-à-queue" et s'effectue lors de la réparation des ADN double brin (Duan et al. 1999; Nakai et al. 2001). Ces épisomes persisteraient dans le noyau cellulaire sous une forme qu'on qualifie de néochromatinienne (Penaud-Budloo et al. 2008). Les épisomes d'AAVr s'associeraient à des histones et ne seraient donc pas éliminés par la cellule.

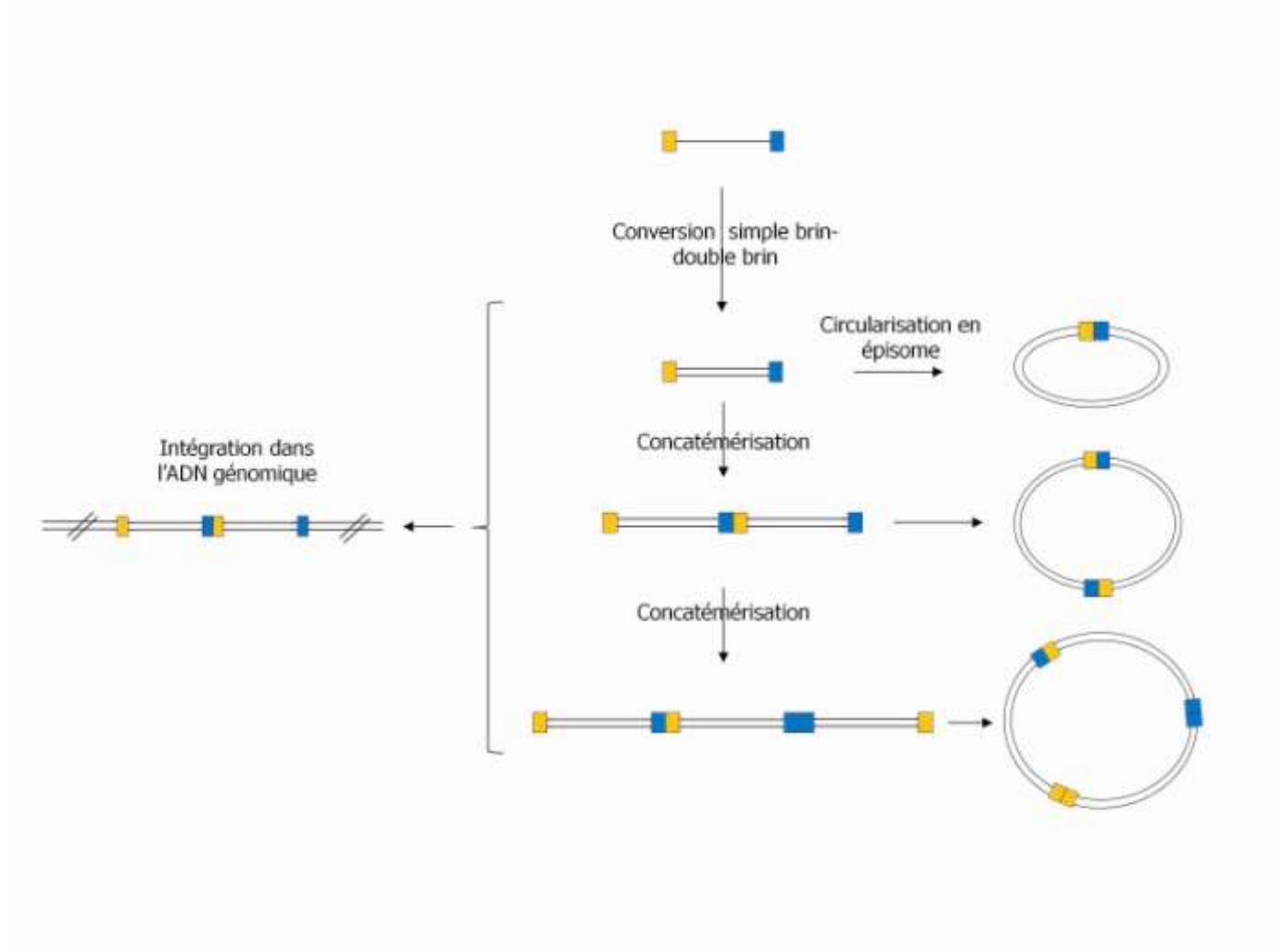


Figure 13 : Devenir du génome d'un AAV recombinant dans le noyau de la cellule hôte

Une fois dans le noyau de la cellule hôte, le génome simple brin de l'AAV est converti en génome double brin puis concatémérisé en tête-à-tête ou tête-à-queue. Lorsque les concatémères se circularisent qu'ils soient sous forme de monomères ou de multimères, ils sont appelés épisome. Plus rarement, le génome viral, sous forme de concatémères ou non, peut s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

3-Intégration d'un AAV sauvage

Les premiers travaux de la caractérisation de la phase de latence de l'AAV ont été grandement facilités par l'établissement de lignées cellulaires contenant l'AAV dans un état quiescent. Berns *et al* ont montré qu'une lignée cellulaire humaine dérivée de la moelle osseuse et proche d'une lignée de fibroblastes conservait les séquences virales dans un état latent pendant au moins 47 passages (Berns et al. 1975). Après clonage des cellules infectées,

les auteurs ont observé que 29% des clones étaient capables de produire des particules d'AAV après co-infection avec un adénovirus et qu'il y avait trois à cinq copies de génome d'AAV par génome cellulaire diploïde. Pour déterminer si l'AAV persiste sous une forme épisomale ou sous une forme intégrative dans ces cellules, une étude postérieure des mêmes auteurs a été réalisée et les fractions d'ADN ont été caractérisées par digestion enzymatique et par Southern blot (Cheung et al. 1980). Les auteurs ont observé que les séquences d'AAV étaient intégrées dans le génome de la cellule hôte sous forme de tandem répété en tête-à-queue, liées au génome cellulaire par les ITR.

Afin d'identifier les sites d'intégration de l'AAV, une librairie d'ADN génomique a été créée, les séquences d'ADN cellulaire qui bordent les provirus AAV ont été isolés (Kotin and Berns 1989). Les résultats démontrent que lorsque l'AAV sauvage est sous forme latente, il s'intègre dans un site commun du génome cellulaire quelle que soit la lignée établie. Une analyse par hybridation révèle que ce site se localise dans le chromosome 19 humain. Ce résultat est confirmé dans une étude de Samulski *et al*/ qui identifie également un site commun d'intégration au provirus AAV dans le chromosome 19 humain (Samulski et al. 1991).

Cette partie du génome cellulaire serait caractérisée par la présence d'une région riche en guanine-cytosine (GC) avec un total de 65% de GC dans les 4000 paires de bases entourant le site d'intégration du provirus. Cette région appelée AAVS1 présente également certaines caractéristiques des îlots CpG qui sont associés à une région transcriptionnellement active (Kotin et al. 1992; Lamartina et al. 2000).

Pour identifier les mécanismes impliqués dans cette intégration et les partenaires viraux et cellulaires, Giraud *et al*/ ont utilisé un système de plasmide stable sous forme d'épisome dans la cellule hôte (Giraud et al. 1994). Ce système a permis de détecter une région de l'AAVS1 de 510pb nécessaire et suffisante à l'intégration site-spécifique de l'AAV sauvage. De plus, dans cette région se trouve une séquence connue pour être un élément de liaison des grandes protéines Rep, Rep68 et Rep78 (Weitzman et al. 1994). Ces protéines sont des protéines non-structurales qui possèdent la capacité de se lier à l'ADN, une activité hélicase et endonucléase nécessaires à la réplication de l'AAV (Im and Muzyczka 1990). Une étude a montré que lorsqu'un AAV sauvage était muté dans le gène Rep, il perdait sa capacité d'intégrer le génome cellulaire dans la région AAVS1, cependant l'intégration est restaurée si les protéines Rep sont apportées en *trans* (Surosky et al. 1997). Ces découvertes ont

clairement identifié un rôle des protéines Rep dans l'intégration non-homologue de l'AAV dans le génome cellulaire.

4-Intégration d'un AAV recombinant

En 1996, dans le but de comparer les mécanismes d'intégration d'un AAV sauvage et d'un AAV recombinant, Kearns *et al* ont infecté la lignée cellulaire d'un épithélium bronchial humain IB3-1 avec soit un AAV sauvage soit un AAV codant pour le gène CFTR (Kearns et al. 1996). Ils ont observé que dans les cellules infectées avec l'AAV sauvage, 94% des cellules positives présentaient une intégration dans le chromosome 19, cependant, bien qu'ils aient identifié des événements intégratifs dans 6% des cellules transduites par l'AAV recombinant, aucun événement intégratif n'a été identifié dans le chromosome 19. Cette étude montre clairement qu'il existe un mécanisme d'intégration de l'AAV dans le génome de la cellule hôte indépendant des protéines Rep 78/68 puisque le vecteur est déficient pour ces protéines, peut-être est-ce le même mécanisme responsable de l'intégration de l'AAV sauvage dans d'autres sites que l'AAVS1 (Drew et al. 2007).

L'intégration de l'AAV recombinant a aussi été étudiée *in vivo*. Nakai et al ont montré que les vecteurs AAV persistaient sous forme extrachromosomique majoritairement lorsqu'ils transduisaient des hépatocytes en division avec 10% des génomes AAVr seulement sous forme intégrative (Nakai et al. 2001). La cinétique d'intégration du vecteur AAV a permis de comprendre que les génomes de vecteur ADN simple brin se perdaient au fil du temps pour laisser place à une forme double-brin de haut poids moléculaire que ce soit dans le foie (Miao et al. 1998) ou dans le muscle (Fisher et al. 1997). Les auteurs de ces deux études identifient cette forme ADN double brin de haut poids moléculaire comme étant des concatémères intégrés.

Les études de mécanistique d'intégration de l'AAV recombinant ont démontré que l'AAV recombinant s'intégrait dans le génome de la cellule hôte par recombinaison non-homologue, et que les cassures de l'ADN du vecteur se situeraient surtout dans les ITR (Nakai et al. 1999). Cette même équipe a étudié les mécanismes d'intégration du vecteur AAV dans un modèle murin de maladie génétique et ont montré que les sites d'intégration se trouvent dans la plupart des cas (72%) dans des gènes qui ont été identifiés comme transcriptionnellement

actifs dans le foie. Plus précisément, les sites d'intégration de l'AAVr se localiseraient au niveau de "point-chaud" et préférentiellement à côté d'éléments régulateurs (Nakai et al. 2003).

Une analyse à grande échelle des sites d'intégration d'un AAV recombinant a été réalisée également *in vitro* dans une lignée de fibroblastes primaires humains. Dans cette étude, les auteurs ont identifié des événements intégratifs dans les 23 paires de chromosomes humains différents avec une localisation dans les chromosomes 7 et 19 significativement plus forte comparé à une fréquence d'insertion aléatoire calculée par ordinateur (Miller et al. 2005). La présence de vecteur AAV dans des îlots CpG et dans des gènes d'ARN ribosomal est commune aux résultats obtenus chez la souris (Nakai et al. 2005).

Toutes ces études ont permis de mettre en évidence la capacité de l'AAV recombinant de s'intégrer au sein du génome cellulaire et d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes d'intégration du vecteur AAV.

C : AAV et CHC

L'intégration d'un vecteur viral AAV conduit à un risque de mutation insertionnelle et donc à une perturbation de l'expression des gènes cellulaires. Des effets génotoxiques sont donc à envisager conduisant à l'inactivation de gènes au niveau du site d'intégration ou encore à la dérégulation des gènes proches à cause des promoteurs et éléments activateurs du provirus. La possibilité la plus inquiétante est la transformation d'une cellule transduite en cellule cancéreuse. La majorité des données expérimentales ont démontré que les vecteurs AAV étaient sûrs en ce sens. En effet, l'incidence de tumeurs hépatiques chez des souris (n=695) ayant reçu différents vecteurs AAV entre 6 et 8 semaines n'est pas augmentée comparé aux contrôles (Bell et al. 2005). De plus, il n'y a pas d'augmentation du nombre de tumeurs après infection par un vecteur AAV chez des souris déficientes pour p53 qui sont sujettes à développer des tumeurs (2007)-S1. Cependant, plusieurs études ont rapporté une augmentation du risque d'apparition d'un CHC chez les souris injectées avec un AAVr. Dans certains cas, les tumeurs apparaissent à cause de séquences oncogéniques présentes dans le génome viral, comme la séquence codant pour la protéine virale du VHB HBx qui serait présente dans la séquence WPRE qui est un élément régulateur post-transcriptionnel (2007)-S216, ou la toxicité de l'expression d'ARNsh qui augmente la division des hépatocytes (2007)-S266. Dans d'autres cas, c'est le vecteur lui-même qui semble être responsable de

l'augmentation de l'incidence de CHC. Une augmentation de la tumorigenèse a été observée chez des souris déficientes pour l'ornithine transcarbamylase (OTC) qui ont reçu un vecteur AAV codant pour le gène LacZ, qui n'est pas connu pour être un transgène oncogénique (Bell et al. 2006). Ces souris présentent un nombre de copies du génome viral parfois très important dans le tissu tumoral (0,023 à 23 copies par cellule) mais en moyenne plus faible que dans le tissu adjacent. Néanmoins, les jonctions provirus-chromosome n'ont pas été étudiées, il est donc difficile de savoir si le vecteur s'est intégré et si c'est le cas, où il s'est intégré.

Des preuves plus convaincantes d'une tumorigenèse induite par l'AAV ont été trouvées dans un modèle de souris déficiente pour la β -glucuronidase. Des souriceaux nouveau-nés atteints de mucopolysaccharidose VII injectés avec un AAV codant pour la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet présentent un risque plus élevé de développer un CHC (Donsante et al. 2001). Bien que des génomes viraux aient été détectés dans le tissu tumoral, les sites d'intégration n'ont pas été identifiés. Une étude postérieure a démontré que l'injection du même vecteur AAV chez des souris non-mutantes augmentait également l'incidence du CHC (33 à 56% comparé à 8,6% pour les contrôles), suggérant que la formation tumorale n'est pas due à la souche de souris utilisée (sauvage versus mutée) mais bien au vecteur AAV lui-même (Donsante et al. 2007). Dans cette étude, la présence de vecteur AAV intégré dans le génome cellulaire a été identifiée dans 4 échantillons de tissu tumoral différents provenant de 4 souris différentes, et la totalité de ces vecteurs AAV intégrés sont localisés dans une région de 6kb dans le chromosome 12. Une analyse microarray a démontré que les gènes proches des sites d'insertion du provirus étaient surexprimés, en particulier les gènes d'une région codant pour des petits ARN nucléolaires, et les gènes d'une autre région codant pour différents microARN. Bien que ces gènes ne soient pas associés au carcinome hépatocellulaire, la survenue d'événements intégratifs dans un même locus dans 4 tumeurs indépendantes suggère que la mutation insertionnelle de l'AAV peut conduire au cancer dans certaines situations. Des recherches plus approfondies sont évidemment requises pour déterminer quels facteurs sont importants dans la tumorigenèse dans ce modèle, incluant l'âge et l'espèce des animaux utilisés et les constructions de vecteur à utiliser (promoteur, élément régulateur, et transgène). Que ce phénomène puisse se produire chez l'Homme est une question cruciale, d'autant plus que des essais cliniques utilisant une stratégie de thérapie génique *in situ* avec un vecteur AAV sont en cours (Manno et al. 2006).

Toutes ces études ont été réalisées chez la souris mais il existe d'autres modèles animaux de maladies génétiques hépatiques traités à l'aide d'un AAV. Par exemple, le modèle de rat Gunn est utilisé pour tester le potentiel thérapeutique d'un AAV codant pour l'UGT1-A1 dans la maladie de Crigler-Najjar que ce soit chez le rat adulte (Seppen et al. 2006) ou chez le rat nouveau-né (Flageul et al. 2009). Nous avons donc évalué le potentiel initiateur de tumeur de l'AAV dans un modèle de carcinogenèse hépatique chez le rat nouveau-né, point commun avec la seule étude qui rapporte un risque élevé d'apparition de CHC chez les animaux traités (Donsante et al. 2007).

D : Résultats

Dans notre laboratoire, plusieurs essais précliniques ont été réalisés chez le rat Gunn, modèle animal de la maladie de Crigler-Najjar. Différents vecteurs viraux ont été utilisés pour corriger la déficience en UGT-A1, enzyme jouant un rôle dans l'élimination de la bilirubine. On peut citer le lentivirus (Schmitt et al. 2010), le rétrovirus (Bellodi-Privato et al. 2005), et l'AAV (Flageul et al. 2009). Dans cette dernière étude, Maude Flageul a montré (i) que l'injection d'un AAVr-UGT-A1 qu'il soit sous le contrôle d'un promoteur CMV ou foie-spécifique induisait une correction transitoire de l'hyperbilirubinémie du rat Gunn suggérant une absence d'extinction du promoteur CMV puisque les deux promoteurs ont une efficacité comparable, (ii) que l'injection d'un AAV recombinant de sérotype 2/8 de type simple brin à 2.10^{13} particules génomiques par kg induisait une persistance de l'expression du transgène dans les hépatocytes à long terme (plus de 3 mois). Cette expression est maintenue grâce à l'intégration de l'AAV recombinant dans le génome de la cellule hôte. L'étude des sites d'intégration par LAM-PCR de groupes de cellules exprimant le transgène de trois rats différents a permis d'identifier les gènes dans lesquels le vecteur AAV s'était inséré et aucun d'eux n'est connu pour être oncogénique.

La capacité du vecteur AAV à s'intégrer dans le génome cellulaire pose le problème majeur de sûreté d'utilisation de ce vecteur en clinique due au risque de mutation insertionnelle. Jusqu'à présent, les études réalisées dans ce but se sont effectuées uniquement chez la souris. Les études de potentiel tumorigène du vecteur AAV à proprement parler ont été réalisées chez la souris adulte de fond C3B6F1 connue pour développer des tumeurs hépatiques spontanées (Bell et al. 2006). Les autres études ont observé le risque d'apparition d'un CHC dans un modèle de souris particulier ayant reçu le vecteur AAV au stade de nouveau-né (Donsante et al. 2001; Donsante et al. 2007).

Pour tester la sûreté du vecteur AAV, nous avons utilisé un vecteur dont le génome code pour un gène neutre et non-thérapeutique, c'est-à-dire un gène qui ne modifiera pas le métabolisme hépatique, la GFP sous le contrôle du promoteur CMV. Ce gène nous permet de suivre le devenir de l'AAV chez l'hôte sans initier par lui-même la carcinogenèse hépatique. Nous avons utilisé un vecteur AAV de deuxième génération, un AAV self-complementary (sc) qui est un vecteur recombinant à ADN double brin. Ce type de vecteur est depuis quelques années largement utilisé dans les essais précliniques et cliniques et remplace petit à petit le

vecteur AAV simple brin. Ce vecteur présente l'avantage de limiter la dose d'AAV recombinant à injecter car il permet une transduction plus efficace des cellules (McCarty et al. 2001). En outre, la caractéristique du vecteur d'être sous une forme double brin l'affranchit de l'étape de réparation de l'ADN que subit un vecteur AAV simple brin et se trouve déjà sous une forme pouvant être intégrée. Nous avons injecté une dose de vecteur AAV plus élevée que celle utilisée en essai clinique dans le traitement de maladies hépatiques (Nathwani et al. 2011b).

Dans le but de tester le potentiel initiateur de la carcinogenèse hépatique de ce vecteur AAV recombinant, nous avons mis au point un modèle de carcinogenèse hépatique basé sur le modèle de Solt-Farber très stringent chez le rat. Les sites d'intégration du vecteur AAV que nous avons utilisé dans ce modèle ont été identifiés par une technique élaborée qui permet de détecter et séquencer des régions d'ADN génomique inconnues, la LAM-PCR (Schmidt et al. 2007). La fiabilité de cette méthode résulte de la pré-amplification initiale de jonctions vecteur-génome qui précède un isolement non ciblé de l'ADN par sélection magnétique. Les étapes suivantes consistent à complémentariser les fragments d'ADN, les digérer et les amplifier par PCR exponentielle puis identifier les séquences obtenues et caractériser leur emplacement dans le génome.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article qui suit.

E : Discussion

Nous avons montré que le nombre de cellules exprimant le transgène et le nombre de copies du vecteur AAV diminuent de façon importante dans les six semaines suivant l'injection de manière comparable à ce qui a été observé par d'autres études que ce soit chez le rat ou la souris (Flageul et al. 2009; Wang et al. 2012). Dans notre étude, le suivi est prolongé jusqu'à 14 semaines post-injection et nous avons observé à ce temps une stabilisation de l'expression du transgène et du nombre de copies génomiques du vecteur. Les cellules exprimant le transgène subsistent sous la forme de clones et en nombre très faible par rapport au nombre initial de cellules positives suggérant des phénomènes intégratifs du vecteur dans un faible pourcentage.

Dans notre modèle de carcinogenèse hépatique basé sur le modèle de Solt-Farber, nous avons démontré que le risque d'apparition de foyers prénéoplasiques était comparable dans le groupe de rats ayant reçu le vecteur AAV et le groupe de rats contrôles et que ce risque était statistiquement différent du risque observé dans le groupe ayant reçu un carcinogène hépatique. Nous avons observé que les clones exprimant le transgène étaient très rarement, voire jamais chez la moitié des rats, également des foyers prénéoplasiques. De plus le nombre de vecteur AAV en termes de copies par génome haploïde est identique que ce soit dans les foyers prénéoplasiques ou dans le parenchyme hépatique adjacent. L'identification des sites d'intégration du vecteur AAV dans le génome de la cellule hôte par LAM-PCR révèle que l'AAV recombinant n'a pas de site préférentiel d'intégration et que les gènes où le vecteur s'est intégré ne sont pas associés à un risque oncogénique.

Nos résultats ne montrent pas d'association entre l'injection d'un AAV recombinant chez le rat nouveau-né et le risque d'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. Ce résultat est d'autant plus pertinent que le vecteur AAV se retrouve dans un environnement très favorable à la transformation cancéreuse des hépatocytes et que si l'insertion de l'AAV dans le génome cellulaire devait conduire à une initiation de la carcinogenèse, nous aurions observé un nombre de foyers prénéoplasiques exprimant le transgène très important.

Nos résultats sont en contradiction avec de précédentes études réalisées chez la souris. Pour tester l'innocuité d'un vecteur AAV, nous avons utilisé une espèce animale différente de celle utilisée par l'équipe de Mark Sands (Donsante et al. 2007) mais avec les mêmes conditions d'injection du vecteur AAV chez le nouveau-né. Seulement, on peut penser que

l'initiation des hépatocytes est différente selon l'espèce et donc l'initiation de la carcinogenèse hépatique par un AAV également. La majorité des données décrites dans la littérature ne vont pas dans ce sens puisqu'elles n'associent pas de risque d'hépatocarcinogenèse à l'injection d'un AAV ni chez le rat ni chez la souris, et que l'AAV soit injecté chez l'animal adulte (Bell et al. 2006; Li et al. 2011) ou l'animal nouveau-né (Ghosh et al. 2006; Lee et al. 2012). Il est important de mentionner que dans leur étude, ils utilisent un vecteur AAV de sérotype 2 qui n'est pas le sérotype le plus adapté pour la transduction d'hépatocyte, et que leur transgène est sous le contrôle du promoteur de la β -actine du poulet, et d'un élément d'amplification de l'expression génique, le CMV enhancer (promoteur CAG). Le CMV enhancer a été montré comme pouvant activer l'expression de gènes en trans sans association physique entre le promoteur et l'enhancer suggérant une possible altération de l'expression des gènes endogènes à distance du site d'intégration (D'Aiuto et al. 2006). Il serait donc recommandable d'utiliser le moins d'éléments de régulation possible et de se limiter à un promoteur pour le contrôle de l'expression du transgène et dans le meilleur des cas utiliser un promoteur spécifique au tissu ciblé. En ce sens, il serait intéressant de réaliser une étude comparable à la nôtre mais avec un promoteur spécifique du foie comme le promoteur de la transthyrétine (TTR) dont l'efficacité a déjà été démontré chez le rat Gunn (Schmitt et al. 2010) ou le promoteur d'une apolipoprotéine (LP1) utilisé pour traiter l'hémophilie B (Nathwani et al. 2011a).

Actuellement, le vecteur AAV n'est utilisé en essai clinique que chez l'adulte. En effet, dans les modèles animaux nouveau-nés, le transgène est perdu au fur et à mesure des divisions cellulaires, ce qui peut conduire à une perte de la correction thérapeutique comme l'a montré notre équipe chez le rat Gunn (Flageul et al. 2009). Son potentiel thérapeutique chez de jeunes patients reste donc à démontrer. En revanche, chez l'adulte, son efficacité a déjà été montrée comme dans l'essai clinique de Nathwani *et al*/ où ils obtiennent une expression à long terme de leur transgène le facteur IX à un niveau thérapeutique chez six patients atteints d'hémophilie B sans effet secondaire majeur prolongé (Nathwani et al. 2011b).

En conclusion, les données utilisant les vecteurs AAV comme outils thérapeutiques commencent à s'accumuler et l'essentiel des résultats obtenus dans ces études montrent une utilisation efficace et sûre des vecteurs AAV. Le traitement de maladies génétiques hépatiques à l'aide de vecteur AAV n'a donc pas fini d'être exploré.

Conclusion

Mon travail au sein de ce laboratoire m'a permis d'approcher deux aspects très différents dans le traitement de pathologies hépatiques avec d'une part l'immunothérapie du cancer du foie et d'autre part, l'utilisation d'un vecteur viral utilisé pour traiter une maladie génétique et son implication dans le CHC.

Mes travaux sur le traitement du carcinome hépatocellulaire à l'aide d'un anticorps agoniste anti-CD137 m'ont permis d'appréhender la pathologie qu'est le cancer du foie. Ses caractéristiques et les propriétés de l'organe en font un challenge thérapeutique très intéressant mais aussi compliqué. La prise en charge d'un CHC est tardive car longtemps asymptomatique et souvent associée au traitement d'une autre pathologie hépatique sous-jacente. Une des particularités du CHC est qu'il se déclare dans la majorité des cas sur un foie pathologique. De plus, la récurrence après un traitement curatif tel que la chirurgie est très fréquente. Il est donc nécessaire de trouver un traitement pouvant agir contre un CHC de stade avancé tout en limitant le risque de récurrence sans affecter la pathologie sous-jacente. L'immunothérapie est candidate pour ce type d'approche. Mes travaux de thèse ont montré qu'une approche d'immunothérapie passive non-spécifique sous la forme d'un anticorps agoniste anti-CD137 permettait d'obtenir une réduction de la charge tumorale et une augmentation de la survie dans deux modèles précliniques de CHC. Ce travail a également permis de mettre en évidence le rôle de populations immunosuppressives dans la réponse anti-tumorale et donc la possibilité de combiner la thérapie par un anti-CD137 avec un traitement suppressif de ces populations. L'immunothérapie offre une multitude de possibilités et n'a donc pas fini d'être évaluée dans le traitement du CHC.

La thérapie génique est à l'heure actuelle une approche thérapeutique très utilisée que ce soit dans le traitement du cancer ou dans le traitement de maladies génétiques. Plusieurs maladies génétiques hépatiques monogéniques existant, cela rend le foie un candidat potentiel pour ce type d'approche. L'AAV est un vecteur efficace dans le traitement de maladies hépatiques telles que l'hémophilie B ou la maladie de Crigler-Najjar. Son intégration dans le génome de la cellule hôte pose cependant le problème de mutation insertionnelle et sa récente association avec l'apparition d'un CHC ont posé la question de sûreté d'utilisation de ce vecteur en clinique. Nos travaux chez le rat nouveau-né ont montré qu'il n'existait pas de risque associé à l'injection d'un vecteur AAV et l'apparition d'un CHC en accord avec d'autres

études réalisées chez l'animal adulte. De plus les événements intégratifs que nous avons détecté sont très faibles et ne sont pas localisés dans ou à proximité d'oncogènes.

L'ensemble de mes travaux ont démontré une utilisation possible de l'immunothérapie à l'aide d'un anti-CD137 dans le traitement du CHC et une utilisation a priori sûre du vecteur AAV dans le traitement de maladies génétiques hépatiques en clinique.

Références bibliographiques

- (1995). "A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire." N Engl J Med **332**(19): 1256-1261.
- (2007). "American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, May 30-June 3, 2007, Seattle, Washington, USA. Abstracts." Mol Ther **15 Suppl 1**: S1-456.
- Adami, H. O., W. H. Chow, et al. (1996). "Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus." J Natl Cancer Inst **88**(20): 1472-1477.
- Adami, H. O., A. W. Hsing, et al. (1992). "Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer." Int J Cancer **51**(6): 898-902.
- Aizawa, Y., Y. Shibamoto, et al. (2000). "Analysis of factors affecting the appearance of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. A long term follow-up study after histologic diagnosis." Cancer **89**(1): 53-59.
- Alba, R., A. Bosch, et al. (2005). "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." Gene Ther **12 Suppl 1**: S18-27.
- Alderson, M. R., C. A. Smith, et al. (1994). "Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand." Eur J Immunol **24**(9): 2219-2227.
- Alexia, C., G. Fallot, et al. (2004). "An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis." Biochem Pharmacol **68**(6): 1003-1015.
- Anzola, M. (2004). "Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis." J Viral Hepat **11**(5): 383-393.
- Arch, R. H. and C. B. Thompson (1998). "4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB." Mol Cell Biol **18**(1): 558-565.
- Arribillaga, L., P. Sarobe, et al. (2005). "Enhancement of CD4 and CD8 immunity by anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies during hepatitis C vaccination with recombinant adenovirus." Vaccine **23**(27): 3493-3499.
- Artandi, S. E., S. Chang, et al. (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice." Nature **406**(6796): 641-645.
- Atchison, R. W., B. C. Casto, et al. (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." Science **149**(3685): 754-756.
- Avila, M. A., C. Berasain, et al. (2006). "New therapies for hepatocellular carcinoma." Oncogene **25**(27): 3866-3884.
- Azechi, H., N. Nishida, et al. (2001). "Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas." Oncology **60**(4): 346-354.
- Bae, J. S., S. J. Park, et al. (2005). "Acute exacerbation of hepatitis in liver cirrhosis with very high levels of alpha-fetoprotein but no occurrence of hepatocellular carcinoma." Korean J Intern Med **20**(1): 80-85.

- Barbason, H., C. Rassenfosse, et al. (1983). "Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect." *Br J Cancer* **47**(4): 517-525.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." *J Clin Invest* **115**(2): 209-218.
- Bell, P., A. D. Moscioni, et al. (2006). "Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver." *Mol Ther* **14**(1): 34-44.
- Bell, P., L. Wang, et al. (2005). "No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice." *Mol Ther* **12**(2): 299-306.
- Bellodi-Privato, M., D. Aubert, et al. (2005). "Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors." *Hepatology* **42**(2): 431-438.
- Benchetrit, F., A. Gazagne, et al. (2003). "[Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]." *Bull Cancer* **90**(8-9): 677-685.
- Berezhnaya, N. M. (2010). "Interaction between tumor and immune system: the role of tumor cell biology." *Exp Oncol* **32**(3): 159-166.
- Berns, K. I., T. C. Pinkerton, et al. (1975). "Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells." *Virology* **68**(2): 556-560.
- Bertram, E. M., P. Lau, et al. (2002). "Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection." *J Immunol* **168**(8): 3777-3785.
- Blazar, B. R., B. S. Kwon, et al. (2001). "Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients." *J Immunol* **166**(5): 3174-3183.
- Borghaei, H., M. R. Smith, et al. (2009). "Immunotherapy of cancer." *Eur J Pharmacol* **625**(1-3): 41-54.
- Boyault, S., D. S. Rickman, et al. (2007). "Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets." *Hepatology* **45**(1): 42-52.
- Bukczynski, J., T. Wen, et al. (2004). "Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1291-1296.
- Butterfield, L. H. (2004). "Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S232-241.
- Butterfield, L. H. (2007). "Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer." *Swiss Med Wkly* **137**(5-6): 83-90.
- Butterfield, L. H., W. S. Meng, et al. (2001). "T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein." *J Immunol* **166**(8): 5300-5308.
- Butterfield, L. H., A. Ribas, et al. (2006). "A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides." *Clin Cancer Res* **12**(9): 2817-2825.
- Butterfield, L. H., A. Ribas, et al. (2003). "T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer." *Clin Cancer Res* **9**(16 Pt 1): 5902-5908.
- Calarota, S. A., D. A. Hokey, et al. (2008). "Augmentation of SIV DNA vaccine-induced cellular immunity by targeting the 4-1BB costimulatory molecule." *Vaccine* **26**(25): 3121-3134.

- Camma, C., F. Schepis, et al. (2002). "Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials." *Radiology* **224**(1): 47-54.
- Cannons, J. L., Y. Choi, et al. (2000). "Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response." *J Immunol* **165**(11): 6193-6204.
- Cannons, J. L., P. Lau, et al. (2001). "4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy." *J Immunol* **167**(3): 1313-1324.
- Cany, J., B. Barteau, et al. (2011a). "AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice." *J Hepatol* **54**(1): 115-121.
- Cany, J., L. Tran, et al. (2011b). "Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: is there a place for regulatory T-lymphocyte depletion?" *Immunotherapy* **3**(4 Suppl): 32-34.
- Capurro, M., I. R. Wanless, et al. (2003). "Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **125**(1): 89-97.
- Cariani, E., M. Pilli, et al. (2012). "Immunological and molecular correlates of disease recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma." *PLoS One* **7**(3): e32493.
- Charles Janeway, P. T., Mark Walport, Mark Shlomchik (2006). *Immunobiology*, Garland Science.
- Chen, S. H., K. B. Pham-Nguyen, et al. (2000). "Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation." *Mol Ther* **2**(1): 39-46.
- Cheng, A. L., Y. K. Kang, et al. (2009). "Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet Oncol* **10**(1): 25-34.
- Cheung, A. K., M. D. Hoggan, et al. (1980). "Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells." *J Virol* **33**(2): 739-748.
- Chew, V., C. Tow, et al. (2012). "Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients." *J Natl Cancer Inst* **104**(23): 1796-1807.
- Chew, V., C. Tow, et al. (2010). "Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients." *J Hepatol* **52**(3): 370-379.
- Chiesa, R., F. Donato, et al. (2000). "Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**(2): 213-216.
- Choi, B. K., Y. H. Kim, et al. (2010). "Peripheral 4-1BB signaling negatively regulates NK cell development through IFN-gamma." *J Immunol* **185**(3): 1404-1411.
- Chu, N. R., M. A. DeBenedette, et al. (1997). "Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells." *J Immunol* **158**(7): 3081-3089.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, et al. (2002). "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." *J Cell Sci* **115**(Pt 4): 679-688.
- Coleman, W. B. (2003). "Mechanisms of human hepatocarcinogenesis." *Curr Mol Med* **3**(6): 573-588.
- Colnot, S., T. Decaens, et al. (2004). "Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17216-17221.
- Corrao, G. and S. Arico (1998). "Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis." *Hepatology* **27**(4): 914-919.

- Cramp, M. E. (1999). "Hbv + Hcv = Hcc?" Gut **45**(2): 168-169.
- D'Aiuto, L., R. De Marco, et al. (2006). "Evidence of the capability of the CMV enhancer to activate in trans gene expression in mammalian cells." DNA Cell Biol **25**(3): 171-180.
- Dawicki, W. and T. H. Watts (2004). "Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo." Eur J Immunol **34**(3): 743-751.
- De Keersmaecker, B., C. Heirman, et al. (2011). "The combination of 4-1BBL and CD40L strongly enhances the capacity of dendritic cells to stimulate HIV-specific T cell responses." J Leukoc Biol **89**(6): 989-999.
- de Lope, C. R., S. Tremosini, et al. (2012). "Management of HCC." J Hepatol **56 Suppl 1**: S75-87.
- DeBenedette, M. A., N. R. Chu, et al. (1995). "Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP." J Exp Med **181**(3): 985-992.
- Degos, F., C. Christidis, et al. (2000). "Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death." Gut **47**(1): 131-136.
- Dennis, P. A. and D. B. Rifkin (1991). "Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 580-584.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." Nature **444**(7119): 638-642.
- Ding, T., J. Xu, et al. (2009). "High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection." Hum Pathol **40**(3): 381-389.
- Donato, F., A. Tagger, et al. (2002). "Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women." Am J Epidemiol **155**(4): 323-331.
- Donsante, A., D. G. Miller, et al. (2007). "AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma." Science **317**(5837): 477.
- Donsante, A., C. Vogler, et al. (2001). "Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors." Gene Ther **8**(17): 1343-1346.
- Drenkard, D., F. M. Becke, et al. (2007). "CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity." FASEB J **21**(2): 456-463.
- Drew, H. R., L. J. Lockett, et al. (2007). "Increased complexity of wild-type adeno-associated virus-chromosomal junctions as determined by analysis of unselected cellular genomes." J Gen Virol **88**(Pt 6): 1722-1732.
- Duan, D., Z. Yan, et al. (1999). "Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates." Virology **261**(1): 8-14.
- Dubrot, J., F. Milheiro, et al. (2010). "Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ." Cancer Immunol Immunother **59**(8): 1223-1233.
- Dudley, M. E., J. C. Yang, et al. (2008). "Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens." J Clin Oncol **26**(32): 5233-5239.
- El-Serag, H. B. (2011). "Hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **365**(12): 1118-1127.
- El-Serag, H. B. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **142**(6): 1264-1273 e1261.

- El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology **132**(7): 2557-2576.
- El-Serag, H. B., T. Tran, et al. (2004). "Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **126**(2): 460-468.
- Elmberg, M., R. Hultcrantz, et al. (2003). "Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives." Gastroenterology **125**(6): 1733-1741.
- Ertle, J., A. Dechene, et al. (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis." Int J Cancer **128**(10): 2436-2443.
- Espandiar, P., L. W. Robertson, et al. (2005). "Comparison of different initiation protocols in the resistant hepatocyte model." Toxicology **206**(3): 373-381.
- Fattovich, G., M. L. Ribero, et al. (2001). "Hepatitis C virus genotypes: distribution and clinical significance in patients with cirrhosis type C seen at tertiary referral centres in Europe." J Viral Hepat **8**(3): 206-216.
- Fattovich, G., T. Stroffolini, et al. (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S35-50.
- Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010). "GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide." 10.
- Filmus, J. and M. Capurro (2004). "Glypican-3 and alphafetoprotein as diagnostic tests for hepatocellular carcinoma." Mol Diagn **8**(4): 207-212.
- Fisher, K. J., K. Jooss, et al. (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." Nat Med **3**(3): 306-312.
- Fisicaro, P., C. Valdatta, et al. (2012). "Combined Blockade of Programmed Death-1 and Activation of CD137 Increase Responses of Human Liver T Cells Against HBV, But Not HCV." Gastroenterology **143**(6): 1576-1585 e1574.
- Flageul, M., D. Aubert, et al. (2009). "Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors." J Gene Med **11**(8): 689-696.
- Foell, J., S. Strahotin, et al. (2003). "CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice." J Clin Invest **111**(10): 1505-1518.
- Freeman, A. J., G. J. Dore, et al. (2001). "Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **34**(4 Pt 1): 809-816.
- Frese, K. K. and D. A. Tuveson (2007). "Maximizing mouse cancer models." Nat Rev Cancer **7**(9): 645-658.
- Fu, J., Z. Zhang, et al. (2012). "The impairment of CD4(+) cytotoxic T cells predicts poor survival and high recurrence rates in patients with hepatocellular carcinoma." Hepatology.
- Futagawa, T., H. Akiba, et al. (2002). "Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells." Int Immunol **14**(3): 275-286.
- Ganguly, S., J. Liu, et al. (2010). "Adjuvantive effects of anti-4-1BB agonist Ab and 4-1BBL DNA for a HIV-1 Gag DNA vaccine: different effects on cellular and humoral immunity." Vaccine **28**(5): 1300-1309.
- Gao, G., L. H. Vandenberghe, et al. (2004). "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues." J Virol **78**(12): 6381-6388.

- Garcia-Samaniego, J., M. Rodriguez, et al. (2001). "Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C." Am J Gastroenterol **96**(1): 179-183.
- Germani, G., M. Pleguezuelo, et al. (2010). "Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." J Hepatol **52**(3): 380-388.
- Ghosh, A., M. Allamarvdasht, et al. (2006). "Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer." Gene Ther **13**(4): 321-329.
- Giraud, C., E. Winocour, et al. (1994). "Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10039-10043.
- Gramaglia, I., D. Cooper, et al. (2000). "Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand." Eur J Immunol **30**(2): 392-402.
- Hacein-Bey-Abina, S., A. Garrigue, et al. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." J Clin Invest **118**(9): 3132-3142.
- Hacker, H. J., H. Mtiro, et al. (1991). "Histochemical profile of mouse hepatocellular adenomas and carcinomas induced by a single dose of diethylnitrosamine." Cancer Res **51**(7): 1952-1958.
- Halstead, E. S., Y. M. Mueller, et al. (2002). "In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses." Nat Immunol **3**(6): 536-541.
- Harada, N., H. Oshima, et al. (2004). "Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations." Cancer Res **64**(1): 48-54.
- Harrison, J. M., E. M. Bertram, et al. (2006). "4-1BBL coexpression enhances HIV-specific CD8 T cell memory in a poxvirus prime-boost vaccine." Vaccine **24**(47-48): 6867-6874.
- Heindryckx, F., I. Colle, et al. (2009). "Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research." Int J Exp Pathol **90**(4): 367-386.
- Heinisch, I. V., C. Bizer, et al. (2001). "Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders." J Allergy Clin Immunol **108**(1): 21-28.
- Heinisch, I. V., I. Daigle, et al. (2000). "CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils." Eur J Immunol **30**(12): 3441-3446.
- Herkel, J., B. Jagemann, et al. (2003). "MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes." Hepatology **37**(5): 1079-1085.
- Hernandez-Chacon, J. A., Y. Li, et al. (2011). "Costimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances antitumor effector function." J Immunother **34**(3): 236-250.
- Hirao, L. A., D. A. Hokey, et al. (2011). "Immune modulation through 4-1BB enhances SIV vaccine protection in non-human primates against SIVmac251 challenge." PLoS One **6**(9): e24250.
- Houot, R., M. J. Goldstein, et al. (2009). "Therapeutic effect of CD137 immunomodulation in lymphoma and its enhancement by Treg depletion." Blood **114**(16): 3431-3438.
- Houot, R., H. Kohrt, et al. (2012). "Boosting antibody-dependant cellular cytotoxicity against tumor cells with a CD137 stimulatory antibody." Oncoimmunology **1**(6): 957-958.
- Hsieh, A., H. S. Kim, et al. (2011). "Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling." Cancer Lett **300**(2): 162-172.

- Hu, T. H., C. C. Huang, et al. (2003). "Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma." *Cancer* **97**(8): 1929-1940.
- Hui, D., L. Qiang, et al. (2009). "A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma." *Dig Liver Dis* **41**(1): 36-41.
- Hurtado, J. C., Y. J. Kim, et al. (1997). "Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death." *J Immunol* **158**(6): 2600-2609.
- Im, D. S. and N. Muzyczka (1990). "The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity." *Cell* **61**(3): 447-457.
- Ito, F., Q. Li, et al. (2004). "Anti-CD137 monoclonal antibody administration augments the antitumor efficacy of dendritic cell-based vaccines." *Cancer Res* **64**(22): 8411-8419.
- Iwashita, Y., S. Goto, et al. (2003). "Potent stimuli combined with lipopolysaccharide and IFNgamma may improve immunotherapy against HCC by increasing the maturation and subsequent immune response of the dendritic cells." *Cancer Biother Radiopharm* **18**(1): 1-6.
- Jang, I. K., Z. H. Lee, et al. (1998). "Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B." *Biochem Biophys Res Commun* **242**(3): 613-620.
- Jean-Claude Barbare, Valérie Boige, et al. (2011). "Chapitre 7 : Carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie)." *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*.
- Josien, R., H. L. Li, et al. (2000). "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **191**(3): 495-502.
- Ju, S. A., S. H. Cheon, et al. (2008). "Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice." *Int J Cancer* **122**(12): 2784-2790.
- June, C. H. (2007). "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic." *J Clin Invest* **117**(6): 1466-1476.
- Kang, Y. J., S. O. Kim, et al. (2007). "Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages." *Nat Immunol* **8**(6): 601-609.
- Kawai, H., T. Suda, et al. (2000). "Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error." *Hepatology* **31**(6): 1246-1250.
- Kawata, A., Y. Une, et al. (1995). "Adjuvant chemimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killer cells versus adriamycin alone." *Am J Clin Oncol* **18**(3): 257-262.
- Kearns, W. G., S. A. Afione, et al. (1996). "Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line." *Gene Ther* **3**(9): 748-755.
- Kelland, L. R. (2004). "Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development." *Eur J Cancer* **40**(6): 827-836.
- Kim, D. H., W. S. Chang, et al. (2008). "4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation." *J Immunol* **180**(4): 2062-2068.
- Kim, D. K., S. C. Lee, et al. (2009). "CD137 ligand-mediated reverse signals increase cell viability and cytokine expression in murine myeloid cells: involvement of mTOR/p70S6 kinase and Akt." *Eur J Immunol* **39**(9): 2617-2628.

- Kim, J., W. S. Choi, et al. (2005). "Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4+ T cells." Blood **105**(5): 2206-2213.
- Kim, J. A., B. J. Averbook, et al. (2001). "Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation." Cancer Res **61**(5): 2031-2037.
- Kim, Y. J., R. R. Brutkiewicz, et al. (2002). "Role of 4-1BB (CD137) in the functional activation of cord blood CD28(-)CD8(+) T cells." Blood **100**(9): 3253-3260.
- Kim, Y. J., S. H. Kim, et al. (1998). "Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses." Eur J Immunol **28**(3): 881-890.
- Kirk, G. D., O. A. Lesi, et al. (2005). "249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma." Oncogene **24**(38): 5858-5867.
- Klein, G., H. O. Sjogren, et al. (1960). "Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host." Cancer Res **20**: 1561-1572.
- Knolle, P., J. Schlaak, et al. (1995). "Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge." J Hepatol **22**(2): 226-229.
- Kobayashi, Y., T. Higashi, et al. (2000). "Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma." J Hepatol **32**(4): 612-617.
- Kocak, E., K. Lute, et al. (2006). "Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity." Cancer Res **66**(14): 7276-7284.
- Korangy, F., L. A. Ormandy, et al. (2004). "Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **10**(13): 4332-4341.
- Kotin, R. M. and K. I. Berns (1989). "Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells." Virology **170**(2): 460-467.
- Kotin, R. M., R. M. Linden, et al. (1992). "Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination." EMBO J **11**(13): 5071-5078.
- Kuang, M., B. G. Peng, et al. (2004). "Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **10**(5): 1574-1579.
- Kwon, B. S., G. S. Kim, et al. (1987). "Isolation and initial characterization of multiple species of T-lymphocyte subset cDNA clones." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2896-2900.
- Laderach, D., M. Movassagh, et al. (2002). "4-1BB co-stimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells." Int Immunol **14**(10): 1155-1167.
- Laderach, D., A. Wesa, et al. (2003). "4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12." Cell Immunol **226**(1): 37-44.
- Ladhams, A., C. Schmidt, et al. (2002). "Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells." J Gastroenterol Hepatol **17**(8): 889-896.
- Lamartina, S., E. Sporeno, et al. (2000). "Characteristics of the adeno-associated virus preintegration site in human chromosome 19: open chromatin conformation and transcription-competent environment." J Virol **74**(16): 7671-7677.
- Langstein, J., J. Michel, et al. (1998). "CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling." J Immunol **160**(5): 2488-2494.

- Langstein, J. and H. Schwarz (1999). "Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor." J Leukoc Biol **65**(6): 829-833.
- Lee, H., H. J. Park, et al. (2011). "Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal." J Surg Res **169**(1): e43-50.
- Lee, H. W., S. J. Park, et al. (2002). "4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1." J Immunol **169**(9): 4882-4888.
- Lee, J. S., I. S. Chu, et al. (2004). "Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling." Hepatology **40**(3): 667-676.
- Lee, S. C., S. A. Ju, et al. (2009). "Stimulation of the molecule 4-1BB enhances host defense against *Listeria monocytogenes* infection in mice by inducing rapid infiltration and activation of neutrophils and monocytes." Infect Immun **77**(5): 2168-2176.
- Lee, W. C., H. C. Wang, et al. (2005). "Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial." J Immunother **28**(5): 496-504.
- Lee, Y. M., H. S. Jun, et al. (2012). "Prevention of hepatocellular adenoma and correction of metabolic abnormalities in murine glycogen storage disease type Ia by gene therapy." Hepatology **56**(5): 1719-1729.
- Lencioni, R., D. Cioni, et al. (2005). "Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation." Radiology **234**(3): 961-967.
- Leonardi, G. C., S. Candido, et al. (2012). "The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review)." Int J Oncol **40**(6): 1733-1747.
- Lerat, H., M. Honda, et al. (2002). "Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus." Gastroenterology **122**(2): 352-365.
- Li, H., N. Malani, et al. (2011). "Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model." Blood **117**(12): 3311-3319.
- Li, Q., J. Ai, et al. (2008). "4-1BB (CD137) ligand enhanced anti-tumor immune response against mouse forestomach carcinoma in vivo." Cell Mol Immunol **5**(5): 379-384.
- Li, Q., A. Carr, et al. (2003). "Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy." Cancer Res **63**(10): 2546-2552.
- Li, Y. W., S. J. Qiu, et al. (2009). "Tumor-infiltrating macrophages can predict favorable prognosis in hepatocellular carcinoma after resection." J Cancer Res Clin Oncol **135**(3): 439-449.
- Lin, G. H., B. J. Sedgmen, et al. (2009). "Endogenous 4-1BB ligand plays a critical role in protection from influenza-induced disease." J Immunol **182**(2): 934-947.
- Lippert, U., K. Zachmann, et al. (2008). "CD137 ligand reverse signaling has multiple functions in human dendritic cells during an adaptive immune response." Eur J Immunol **38**(4): 1024-1032.
- Llovet, J. M. and J. Bruix (2003). "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival." Hepatology **37**(2): 429-442.
- Llovet, J. M., J. Fuster, et al. (1999). "Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation." Hepatology **30**(6): 1434-1440.
- Llovet, J. M., S. Ricci, et al. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **359**(4): 378-390.

- Lohse, A. W., P. A. Knolle, et al. (1996). "Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells." Gastroenterology **110**(4): 1175-1181.
- Lygidakis, N. J., P. Kosmidis, et al. (1995). "Combined transarterial targeting locoregional immunotherapy-chemotherapy for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a new alternative for an old problem." J Interferon Cytokine Res **15**(5): 467-472.
- Manno, C. S., G. F. Pierce, et al. (2006). "Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response." Nat Med **12**(3): 342-347.
- Marelli, L., R. Stigliano, et al. (2007). "Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies." Cardiovasc Intervent Radiol **30**(1): 6-25.
- Martinet, O., C. M. Divino, et al. (2002). "T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer." Gene Ther **9**(12): 786-792.
- Marukawa, Y., Y. Nakamoto, et al. (2012). "Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma." Cancer Gene Ther **19**(5): 312-319.
- Marvel, J. and T. Walzer (2010). "CD137 in NK cells." Blood **115**(15): 2987-2988.
- Maus, M. V., A. K. Thomas, et al. (2002). "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB." Nat Biotechnol **20**(2): 143-148.
- May, K. F., Jr., L. Chen, et al. (2002). "Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8+ T cells." Cancer Res **62**(12): 3459-3465.
- Mazzaferro, V., J. M. Llovet, et al. (2009). "Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis." Lancet Oncol **10**(1): 35-43.
- Mazzaferro, V., E. Regalia, et al. (1996). "Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis." N Engl J Med **334**(11): 693-699.
- McCarty, D. M., P. E. Monahan, et al. (2001). "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis." Gene Ther **8**(16): 1248-1254.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-323.
- McIlroy, D., B. Barteau, et al. (2009). "DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres promote low-dose DNA vaccination." Mol Ther **17**(8): 1473-1481.
- Melero, I., N. Bach, et al. (1998a). "Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway." Eur J Immunol **28**(3): 1116-1121.
- Melero, I., J. V. Johnston, et al. (1998b). "NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies." Cell Immunol **190**(2): 167-172.
- Melero, I., O. Murillo, et al. (2008). "Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies." Trends Pharmacol Sci **29**(8): 383-390.

- Melero, I., W. W. Shuford, et al. (1997). "Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors." Nat Med **3**(6): 682-685.
- Miao, C. H., R. O. Snyder, et al. (1998). "The kinetics of rAAV integration in the liver." Nat Genet **19**(1): 13-15.
- Miller, D. G., G. D. Trobridge, et al. (2005). "Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells." J Virol **79**(17): 11434-11442.
- Miller, R. E., J. Jones, et al. (2002). "4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner." J Immunol **169**(4): 1792-1800.
- Mittler, R. S., T. S. Bailey, et al. (1999). "Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy." J Exp Med **190**(10): 1535-1540.
- Moens, L., A. Jeurissen, et al. (2007). "Distinct approaches to investigate the importance of the murine 4-1BB 4-1BBL interaction in the antibody response to *Streptococcus pneumoniae*." J Leukoc Biol **82**(3): 638-644.
- Molckovsky, A. and L. L. Siu (2008). "First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting." J Hematol Oncol **1**: 20.
- Montella, M., A. Crispo, et al. (2011). "HCC, diet and metabolic factors: Diet and HCC." Hepat Mon **11**(3): 159-162.
- Murakami, Y., K. Saigo, et al. (2005). "Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas." Gut **54**(8): 1162-1168.
- Murillo, O., A. Arina, et al. (2008). "Therapeutic antitumor efficacy of anti-CD137 agonistic monoclonal antibody in mouse models of myeloma." Clin Cancer Res **14**(21): 6895-6906.
- Myers, L., C. Takahashi, et al. (2003). "Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5348-5353.
- Myers, L. M. and A. T. Vella (2005). "Interfacing T-cell effector and regulatory function through CD137 (4-1BB) co-stimulation." Trends Immunol **26**(8): 440-446.
- Nakai, H., Y. Iwaki, et al. (1999). "Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver." J Virol **73**(7): 5438-5447.
- Nakai, H., E. Montini, et al. (2003). "AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice." Nat Genet **34**(3): 297-302.
- Nakai, H., X. Wu, et al. (2005). "Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver." J Virol **79**(6): 3606-3614.
- Nakai, H., S. R. Yant, et al. (2001). "Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo." J Virol **75**(15): 6969-6976.
- Nathwani, A. C., C. Rosales, et al. (2011a). "Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins." Mol Ther **19**(5): 876-885.
- Nathwani, A. C., E. G. Tuddenham, et al. (2011b). "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B." N Engl J Med **365**(25): 2357-2365.
- Neuschwander-Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003). "Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference." Hepatology **37**(5): 1202-1219.

- Niederau, C., S. Lange, et al. (1998). "Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study." Hepatology **28**(6): 1687-1695.
- Nishimoto, H., S. W. Lee, et al. (2005). "Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor." Blood **106**(13): 4241-4248.
- Niu, L., S. Strahotin, et al. (2007). "Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice." J Immunol **178**(7): 4194-4213.
- Norris, S., C. Collins, et al. (1998). "Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes." J Hepatol **28**(1): 84-90.
- Nozawa, K., J. Ohata, et al. (2001). "Preferential blockade of CD8(+) T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute and chronic graft-versus-host diseases." J Immunol **167**(9): 4981-4986.
- Pages, F., J. Galon, et al. (2010). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." Oncogene **29**(8): 1093-1102.
- Palazon, A., A. Teijeira, et al. (2011). "Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes." Cancer Res **71**(3): 801-811.
- Palmer, D. H., R. S. Midgley, et al. (2009). "A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma." Hepatology **49**(1): 124-132.
- Pan, C. C., Z. L. Huang, et al. (2010). "Serum alpha-fetoprotein measurement in predicting clinical outcome related to autologous cytokine-induced killer cells in patients with hepatocellular carcinoma undergone minimally invasive therapy." Chin J Cancer **29**(6): 596-602.
- Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, et al. (2003). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene." Oncogene **22**(25): 3911-3916.
- Pauly, S., K. Broll, et al. (2002). "CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers." J Leukoc Biol **72**(1): 35-42.
- Pedroza-Gonzalez, A., C. Verhoef, et al. (2013). "Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer." Hepatology **57**(1): 183-194.
- Pelletier, G., M. Ducreux, et al. (1998). "Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with lipiodol chemoembolization: a multicenter randomized trial. Groupe CHC." J Hepatol **29**(1): 129-134.
- Penaud-Budloo, M., C. Le Guiner, et al. (2008). "Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle." J Virol **82**(16): 7875-7885.
- Peng, B. G., L. J. Liang, et al. (2005). "Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **11**(5): 700-704.
- Pitot, H. C. and Y. P. Dragan (1991). "Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis." FASEB J **5**(9): 2280-2286.
- Plentz, R. R., Y. N. Park, et al. (2007). "Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis." Hepatology **45**(4): 968-976.
- Pulle, G., M. Vidric, et al. (2006). "IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival." J Immunol **176**(5): 2739-2748.

- Qian, G. S., R. K. Ross, et al. (1994). "A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**(1): 3-10.
- Redente, E. F., L. D. Dwyer-Nield, et al. (2009). "Lung tumor growth is stimulated in IFN-gamma-/- mice and inhibited in IL-4Ralpha-/- mice." *Anticancer Res* **29**(12): 5095-5101.
- Reinisch, W., M. Holub, et al. (2002). "Prospective pilot study of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma in patients with inoperable hepatocellular carcinoma." *J Immunother* **25**(6): 489-499.
- Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." *Cancer Res* **64**(16): 5839-5849.
- Rosmorduc, I. (1999). "Dépistage et prévention du carcinome hépatocellulaire au cours des cirrhoses " http://www.bmlweb.org/du_st_antoine9913.html.
- Sabbagh, L., G. Pulle, et al. (2008). "ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo." *J Immunol* **180**(12): 8093-8101.
- Saiki, H., J. Suzuki, et al. (2008). "Blockade of the 4-1BB pathway attenuates graft arterial disease in cardiac allografts." *Int Heart J* **49**(1): 105-118.
- Salem, R., R. J. Lewandowski, et al. (2011). "Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **140**(2): 497-507 e492.
- Samulski, R. J., X. Zhu, et al. (1991). "Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19." *EMBO J* **10**(12): 3941-3950.
- Sangro, B., G. Mazzolini, et al. (2004). "Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors." *J Clin Oncol* **22**(8): 1389-1397.
- Sanyal, A. J., S. K. Yoon, et al. (2010). "The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment." *Oncologist* **15** Suppl 4: 14-22.
- Saoulli, K., S. Y. Lee, et al. (1998). "CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand." *J Exp Med* **187**(11): 1849-1862.
- Sawada, Y., T. Yoshikawa, et al. (2012). "Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival." *Clin Cancer Res* **18**(13): 3686-3696.
- Schmidt, M., K. Schwarzwaelder, et al. (2007). "High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR)." *Nat Methods* **4**(12): 1051-1057.
- Schmitt, F., S. Remy, et al. (2010). "Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats." *Gastroenterology* **139**(3): 999-1007, 1007 e1001-1002.
- Schneider, C., A. Teufel, et al. (2012). "Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer." *Gut* **61**(12): 1733-1743.
- Schultz, B. R. and J. S. Chamberlain (2008). "Recombinant adeno-associated virus transduction and integration." *Mol Ther* **16**(7): 1189-1199.
- Seo, S. K., J. H. Choi, et al. (2004). "4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis." *Nat Med* **10**(10): 1088-1094.

- Seo, S. K., H. Y. Park, et al. (2003). "Blocking 4-1BB/4-1BB ligand interactions prevents herpetic stromal keratitis." J Immunol **171**(2): 576-583.
- Seppen, J., C. Bakker, et al. (2006). "Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats." Mol Ther **13**(6): 1085-1092.
- Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, et al. (2003). "Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **170**(4): 2053-2063.
- Shi, W. and D. W. Siemann (2006). "Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment." Anticancer Res **26**(5A): 3445-3453.
- Shin, H. R., J. K. Oh, et al. (2010). "Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors." Cancer Sci **101**(3): 579-585.
- Shirabe, K., Y. Mano, et al. (2012). "Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma." Surg Today **42**(1): 1-7.
- Shuford, W. W., K. Klussman, et al. (1997). "4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses." J Exp Med **186**(1): 47-55.
- Sluiter, B. J., M. F. van den Hout, et al. (2010). "4-1BB-mediated expansion affords superior detection of in vivo primed effector memory CD8+ T cells from melanoma sentinel lymph nodes." Clin Immunol **137**(2): 221-233.
- Snyder, R. O., D. S. Im, et al. (1993). "Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein." J Virol **67**(10): 6096-6104.
- Solt, D. B., A. Medline, et al. (1977). "Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis." Am J Pathol **88**(3): 595-618.
- Su, H., J. Zhao, et al. (2008). "Large-scale analysis of the genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma from Southeast China." Mutat Res **641**(1-2): 27-35.
- Sun, B. and M. Karin (2012). "Obesity, inflammation, and liver cancer." J Hepatol **56**(3): 704-713.
- Sun, Y., H. M. Chen, et al. (2002a). "Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease." Nat Med **8**(12): 1405-1413.
- Sun, Y., X. Lin, et al. (2002b). "Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **168**(3): 1457-1465.
- Surosky, R. T., M. Urabe, et al. (1997). "Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome." J Virol **71**(10): 7951-7959.
- Suzuki, E., V. Kapoor, et al. (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." Clin Cancer Res **11**(18): 6713-6721.
- Sytwu, H. K., W. D. Lin, et al. (2003). "Anti-4-1BB-based immunotherapy for autoimmune diabetes: lessons from a transgenic non-obese diabetic (NOD) model." J Autoimmun **21**(3): 247-254.
- Sznol, M., F. S. Hodi, et al. (2008). "Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA)." Journal of clinical oncology **26**(15): (May 20 suppl; abstr 3007)
- Takahashi, C., R. S. Mittler, et al. (1999). "Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal." J Immunol **162**(9): 5037-5040.

- Takayama, T., M. Makuuchi, et al. (1991). "Distribution and therapeutic effect of intraarterially transferred tumor-infiltrating lymphocytes in hepatic malignancies. A preliminary report." Cancer **68**(11): 2391-2396.
- Takayama, T., T. Sekine, et al. (2000). "Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial." Lancet **356**(9232): 802-807.
- Tan, J. T., J. Ha, et al. (2000). "Analysis of expression and function of the costimulatory molecule 4-1BB in alloimmune responses." Transplantation **70**(1): 175-183.
- Tan, X. H. and Q. Zhu (2008). "[Synergic effect of adenoviral vector-encoding human alpha-fetoprotein and interferon-gamma on immunity against hepatocellular carcinoma in mice]." Ai Zheng **27**(2): 155-159.
- Tan, X. H., Q. Zhu, et al. (2006). "[Immunization with dendritic cells infected with human AFP adenovirus vector effectively elicits immunity against mouse hepatocellular carcinomas]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **28**(1): 13-16.
- Thorgeirsson, S. S. and E. Santoni-Rugiu (1996). "Transgenic mouse models in carcinogenesis: interaction of c-myc with transforming growth factor alpha and hepatocyte growth factor in hepatocarcinogenesis." Br J Clin Pharmacol **42**(1): 43-52.
- Tirapu, I., A. Arina, et al. (2004). "Improving efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cells injected into murine colon cancer with anti-CD137 monoclonal antibodies and alloantigens." Int J Cancer **110**(1): 51-60.
- Tran, L., J. P. Judor, et al. (2012). "The immunogenicity of the tumor-associated antigen alpha-fetoprotein is enhanced by a fusion with a transmembrane domain." J Biomed Biotechnol **2012**: 878657.
- Tu, Z., A. Bozorgzadeh, et al. (2007). "The activation state of human intrahepatic lymphocytes." Clin Exp Immunol **149**(1): 186-193.
- Turati, F., R. Talamini, et al. (2012). "Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma risk." Br J Cancer.
- Tuveson, D. A. and T. Jacks (2002). "Technologically advanced cancer modeling in mice." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 105-110.
- Une, Y., A. Kawata, et al. (1991). "[Adopted immunochemotherapy using IL-2 and spleen LAK cell--randomized study]." Nihon Geka Gakkai Zasshi **92**(9): 1330-1333.
- van Gijssel, H. E., C. B. Maassen, et al. (1997). "p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion." Carcinogenesis **18**(5): 1027-1033.
- van Golen, R. F., T. M. van Gulik, et al. (2012). "The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion." Cytokine Growth Factor Rev **23**(3): 69-84.
- Vargas, J., Jr., G. L. Gusella, et al. (2004). "Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer." Hum Gene Ther **15**(4): 361-372.
- Vermijlen, D., D. Luo, et al. (1999). "Pit cells (Hepatic natural killer cells) of the rat induce apoptosis in colon carcinoma cells by the perforin/granzyme pathway." Hepatology **29**(1): 51-56.
- Vesselinovitch, S. D. and N. Mihailovich (1983). "Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse." Cancer Res **43**(9): 4253-4259.
- Vezys, V., P. Penalzo-MacMaster, et al. (2011). "4-1BB signaling synergizes with programmed death ligand 1 blockade to augment CD8 T cell responses during chronic viral infection." J Immunol **187**(4): 1634-1642.

- Villanueva, A. and J. M. Llovet (2011). "Targeted therapies for hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **140**(5): 1410-1426.
- Villanueva, A., P. Newell, et al. (2007). "Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma." Semin Liver Dis **27**(1): 55-76.
- Vinas, O., R. Bataller, et al. (2003). "Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation." Hepatology **38**(4): 919-929.
- Vinay, D. S. and B. S. Kwon (1998). "Role of 4-1BB in immune responses." Semin Immunol **10**(6): 481-489.
- Vincent, J., G. Mignot, et al. (2010). "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." Cancer Res **70**(8): 3052-3061.
- Vitale, F. V., P. Romeo, et al. (2007). "Hepatic intra-arterial interferon alpha 2b-based immunotherapy combined with 5-fluorouracil (5-FU)-based systemic chemotherapy for patients with hepatocellular carcinoma (HCC) not responsive and/or not eligible for conventional treatments: a pilot study." Anticancer Res **27**(6B): 4077-4081.
- Wada, Y., O. Nakashima, et al. (1998). "Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration." Hepatology **27**(2): 407-414.
- Walshe, J. M., E. Waldenstrom, et al. (2003). "Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease." QJM **96**(9): 657-662.
- Walter, S. R., H. H. Thein, et al. (2011). "Risk factors for hepatocellular carcinoma in a cohort infected with hepatitis B or C." J Gastroenterol Hepatol **26**(12): 1757-1764.
- Wan, Y. L., S. S. Zheng, et al. (2004). "Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity." World J Gastroenterol **10**(2): 195-199.
- Wang, C., G. H. Lin, et al. (2009). "Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges." Immunol Rev **229**(1): 192-215.
- Wang, J., Z. Guo, et al. (2003). "Role of 4-1BB in allograft rejection mediated by CD8+ T cells." Am J Transplant **3**(5): 543-551.
- Wang, J., W. Zhao, et al. (2010). "CD137-mediated pathogenesis from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-transgenic mice." J Immunol **185**(12): 7654-7662.
- Wang, L., H. Wang, et al. (2012). "Hepatic Gene Transfer in Neonatal Mice by Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector." Hum Gene Ther.
- Wang, Y., H. Chen, et al. (1997). "Postoperative immunotherapy for patients with hepatocarcinoma using tumor-infiltrating lymphocytes." Chin Med J (Engl) **110**(2): 114-117.
- Watts, A. D., N. H. Hunt, et al. (1999). "A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'." EMBO J **18**(8): 2119-2126.
- Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, et al. (1994). "Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 5808-5812.
- Wen, T., J. Bukczynski, et al. (2002). "4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function." J Immunol **168**(10): 4897-4906.

- WHO (2008). "WHO : World Health Organization fact sheet for world wide prevalence of obesity." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, et al. (2002). "Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis." *FASEB J* **16**(9): 935-942.
- Wilcox, R. A., D. B. Flies, et al. (2002a). "Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors." *J Clin Invest* **109**(5): 651-659.
- Wilcox, R. A., K. Tamada, et al. (2002b). "Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity." *J Immunol* **169**(8): 4230-4236.
- Williams, G. M., M. J. Iatropoulos, et al. (2000). "Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminofluorene and diethylnitrosamine." *Toxicol Pathol* **28**(3): 388-395.
- Wong, C. M., S. T. Fan, et al. (2001). "beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance." *Cancer* **92**(1): 136-145.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (1992). "The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization." *Exp Gerontol* **27**(4): 383-389.
- Wu, H. C. and R. Santella (2012). "The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma." *Hepat Mon* **12**(10 HCC): e7238.
- Wu, Z. Q., A. Q. Khan, et al. (2003). "4-1BB (CD137) differentially regulates murine in vivo protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses to *Streptococcus pneumoniae*." *Infect Immun* **71**(1): 196-204.
- Xiong, J., Y. C. Yao, et al. (2003). "Expression of hepatitis B virus X protein in transgenic mice." *World J Gastroenterol* **9**(1): 112-116.
- Xu, D., P. Gu, et al. (2004). "NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation." *Int J Cancer* **109**(4): 499-506.
- Yam, J. W., C. M. Wong, et al. (2010). "Molecular and functional genetics of hepatocellular carcinoma." *Front Biosci (Schol Ed)* **2**: 117-134.
- Yamada, T., A. T. De Souza, et al. (1997). "Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10351-10355.
- Yan, X., B. D. Johnson, et al. (2004). "Murine CD8 lymphocyte expansion in vitro by artificial antigen-presenting cells expressing CD137L (4-1BBL) is superior to CD28, and CD137L expressed on neuroblastoma expands CD8 tumour-reactive effector cells in vivo." *Immunology* **112**(1): 105-116.
- Yang, J. D., W. R. Kim, et al. (2011). "Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma." *Clin Gastroenterol Hepatol* **9**(1): 64-70.
- Ye, Z., I. Hellstrom, et al. (2002). "Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB." *Nat Med* **8**(4): 343-348.
- Yi, Y., H. W. He, et al. (2012). "The functional impairment of HCC-infiltrating gammadelta T cells, partially mediated by regulatory T cells in a TGFbeta- and IL-10-dependent manner." *J Hepatol*.

- Yoshida, H., Y. Katayose, et al. (2003). "A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity." Cancer Immunol Immunother **52**(2): 97-106.
- Yoshida, H., Y. Shiratori, et al. (1999). "Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy." Ann Intern Med **131**(3): 174-181.
- Youlin, K., Z. Li, et al. (2012). "Combination immunotherapy with 4-1BBL and CTLA-4 blockade for the treatment of prostate cancer." Clin Dev Immunol **2012**: 439235.
- Zanetti, A. R., P. Van Damme, et al. (2008). "The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview." Vaccine **26**(49): 6266-6273.
- Zerbini, A., M. Pilli, et al. (2004). "Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma." J Hepatol **40**(1): 102-109.
- Zhang, B., C. H. Maris, et al. (2007). "Immune suppression or enhancement by CD137 T cell costimulation during acute viral infection is time dependent." J Clin Invest **117**(10): 3029-3041.
- Zhang, W., J. Liu, et al. (2008). "Immunotherapy of hepatocellular carcinoma with a vaccine based on xenogeneic homologous alpha fetoprotein in mice." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 10-14.
- Zhang, X., H. Zhang, et al. (2006). "Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer." J Lab Clin Med **147**(2): 58-66.
- Zheng, G., B. Wang, et al. (2004). "The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(4): 2428-2434.
- Zhou, Y. M., W. Y. Shao, et al. (2011). "Meta-analysis of laparoscopic versus open resection for hepatocellular carcinoma." Dig Dis Sci **56**(7): 1937-1943.
- Zhu, X. D., J. B. Zhang, et al. (2008). "High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma." J Clin Oncol **26**(16): 2707-2716.
- Zhu, Y., G. Zhu, et al. (2007). "CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype." Blood **109**(11): 4882-4889.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente 6% de tous les cancers dans le monde et son incidence est en constante augmentation. Il n'existe pas actuellement de thérapie satisfaisante pour traiter un CHC. L'immunothérapie est une stratégie prometteuse, notamment en tant que thérapie adjuvante pour combattre la récurrence qui survient dans 70% des cas à 5 ans.

Les travaux de recherche présentés ici ont eu pour but d'une part de tester le potentiel thérapeutique d'un anticorps agoniste anti-CD137 sur deux modèles murins précliniques de CHC, et d'autre part d'évaluer le potentiel tumorigène de l'injection d'un virus adéno-associé recombinant dans le foie d'un rat nouveau-né.

Nos travaux montrent que l'injection d'un anticorps monoclonal agoniste anti-CD137 induit un effet thérapeutique dans nos deux modèles précliniques de CHC et que cet effet est médié par les lymphocytes T CD8 et les cellules NK. L'effet thérapeutique reste cependant partiel. Nous avons identifié la présence de cellules myéloïdes suppressives et de lymphocytes T régulateurs dans les souris qui ne répondent pas au traitement suggérant une possible amplification de la réponse anti-tumorale par un traitement déplétant. L'ensemble de ces résultats indiquent que le traitement du CHC par un anti-CD137 est une stratégie prometteuse.

Nos travaux ont permis également de montrer que l'injection d'un AAV chez le rat nouveau-né n'était pas associée à un risque d'initiation d'un CHC augmenté et que les phénomènes d'intégration n'étaient pas corrélés avec un développement tumoral, ni avec un site d'intégration préférentiel. L'utilisation de ce vecteur viral en clinique dans le traitement de maladies génétiques est donc envisageable.

Hepatocellular carcinoma : Anti-CD137 antibody targeted immunotherapy and tumorigenic potential of recombinant AAV

Six per cent of the total cancer worldwide is due to hepatocellular carcinoma (HCC) and its incidence is increasing steadily. Currently, there is no satisfying therapy to treat HCC. Immunotherapy is a promising strategy, mostly to treat recurrence which occurs in 70% of patients within 5 years.

The aim of the work presented herein is, first, to evaluate the therapeutic potential of an agonistic anti-CD137 antibody on two preclinical murine models of HCC and, second, to evaluate the tumorigenic potential of adeno-associated virus transduction in the newborn rat liver.

Our results demonstrated that injection of agonistic anti-CD137 antibody leads to a therapeutic effect in the two murine models of HCC, and this effect is mediated mainly by CD8 T cells and NK cells. The therapeutic effect is partial. We have identified myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells in the liver of non-responder treated mice, suggesting a possible amplification of the anti-CD137 therapeutic effect by depleting these immunosuppressive cells. Taken together, our results indicate that treatment of HCC with an agonistic anti-CD137 antibody is a promising therapy.

Our results showed that AAV injection in newborn rats is not associated with higher risk of HCC and integration of the vector is neither correlated with a tumor development, nor with a preferential integration site. In conclusion, AAV as a vector to treat hepatic genetic disorders appears safe.

Hepatocellular carcinoma, immunotherapy, agonistic anti-CD137 antibody, recombinant AAV

Vanessa Gauttier-INSERM UMR1064-ITERT-CHU Hôtel-Dieu-Nantes