

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

# **Immunothérapie du carcinome hépatocellulaire (CHC) avec des virus de la vaccine recombinants exprimant l'alpha-foetoprotéine (AFP)**

## **THESE DE DOCTORAT**

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE  
Discipline Biologie, médecine et santé  
Spécialité Biologie cellulaire

*Présentée et soutenue publiquement par*

**TRAN Lucile**

Le 7 janvier 2011, devant le jury ci-dessous

<b><i>Président</i></b>	M. Jacques Le Pendu, Directeur de recherche INSERM, IRT1 Nantes
<b><i>Rapporteurs</i></b>	Mme Valérie Pierrefite-Carle, CNRS, Faculté de Médecine de Nice M. Robert Drillien, Directeur de recherche INSERM, IGBMC Strasbourg
<b><i>Examineur</i></b>	M. Ronald Rooke, Responsable section Immunopharmacologie, Transgene, Strasbourg
<b><i>Directeurs</i></b>	Mme Sophie Conchon, Chargée de recherche INSERM, CHU de Nantes M. Georges Vassaux, Directeur de recherche INSERM, CHU de Nantes

**ABREVIATIONS UTILISEES**

<b>5-FU</b>	5-FluoroUracile
<b>Ad</b>	Adénovirus
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AFP</b>	Alpha-FoetoProtéine
<b>ALT</b>	Alternative Lengthening of Telomeres
<b>ANRS</b>	Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales
<b>APAF-1</b>	Apoptotic peptidase activating factor 1
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>BAD</b>	Bcl-2-Associated Death promoter
<b>BCG</b>	Bacille Calmette-Guérin
<b>bps</b>	base pairs
<b>CAF</b>	Cancer-Associated Fibroblast
<b>CAR</b>	Coxsackievirus and Adenovirus Receptor
<b>CEA</b>	CarcinoEmbryonic Antigen
<b>CEP</b>	Cellule Embryonnaire de Poulet
<b>CHC</b>	Carcinome HépatoCellulaire
<b>CIAH</b>	Chimiothérapie Intra-Artérielle Hépatique
<b>c-MET</b>	Mesenchymal-Epithelial Transition factor
<b>CMH-I</b>	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
<b>CMH-II</b>	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigène
<b>CTL</b>	cytotoxic T lymphocyte
<b>CTLA-4</b>	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
<b>DC</b>	Dendritic cell
<b>DEN</b>	Diéthylnitrosamine
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FPV</b>	Fowlpoxvirus
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>GPC3</b>	Glypican 3
<b>GPT</b>	xanthine-Guanine Phosphoribosyl-Transférase
<b>HBsAg</b>	Hepatitis-B-Virus surface Antigen
<b>HER2</b>	Human Epidermal growth factor Receptor 2
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIV-1</b>	Human Immunodeficiency Virus - 1
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen
<b>HNF1A</b>	Hepatic Nuclear Factor 1A
<b>HPV</b>	Human Papilloma Virus
<b>HSPG</b>	Protéoglycanes d'Héparane Sulfate

<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus
<b>hTERT</b>	human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>HTLV-1</b>	Human T-Lymphotropic Virus 1
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IDO</b>	Indoleamine 2,3-dioxygenase
<b>IGF</b>	Insulin-Like Growth Factor
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL</b>	InterLeukin
<b>IL6ST</b>	InterLeukin 6 Signal Transducer
<b>INVS</b>	Institut National de Veille Sanitaire
<b>IP-10</b>	interferon inducible protein 10
<b>Kda</b>	KiloDalton
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kg</b>	Kilogramme
<b>LAK</b>	Lymphokine-Activated Killer cell
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MEK</b>	MAP Kinase Kinase
<b>mg</b>	milligramme
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>MUC1</b>	Mucin 1
<b>MVA</b>	Modified Virus Ankara
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor $\kappa$ B
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>NIS</b>	Natrium Iodide Symporter
<b>NK</b>	cellules Natural Killer
<b>PAP</b>	phosphatase acide prostatique
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>pCMV</b>	promoteur CytoMégaloVirus
<b>PD-1</b>	Programmed Death-1
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PD-L1</b>	Programmed Death-Ligand 1
<b>PET</b>	Positron Emission Tomography
<b>PFU</b>	Plaque Forming Units
<b>PI3K/AKT/mTOR</b>	Phosphatidylinositol-3 Kinase/AKT/mammalian Target Of Rapamycin
<b>pRb</b>	protéine du Rétinoblastome
<b>PSA</b>	Prostate Specific Antigen
<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>RANTES</b>	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>RFA</b>	RadioFrequency Ablation
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species

<b>SDF-1<math>\alpha</math></b>	Stromal cell-Derived Factor-1
<b>SPECT</b>	Single Photon Emission Computed Tomography
<b>TAA</b>	Tumor Associated Antigen
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TH</b>	Transplantation Hépatique
<b>TIL</b>	tumor-infiltrating lymphocytes
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand
<b>TRAILR</b>	TRAIL Receptor
<b>Treg</b>	Lymphocytes T régulateurs
<b>TSP</b>	Trombospondine
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'hépatite C

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** Estimation des dix cancers les plus diagnostiqués et les plus mortels par sexe aux Etats-Unis en 2010.

**Figure 2 :** Evolution annuelle du taux de mortalité associé à certains types de cancers en fonction du sexe aux Etats-Unis entre 1930 et 2006.

**Figure 3 :** Capacités acquises par les cellules tumorales pour assurer leur développement.

**Figure 4 :** Cycle cellulaire et point de contrôle.

**Figure 5 :** Sénescence et tumorigenèse médiées par les télomères.

**Figure 6:** Vue simplifiée des différents constituants cellulaires d'une tumeur.

**Figure 7:** Représentation schématique des mécanismes induits par les membres de la famille du FGF dans les cellules endothéliales contribuant à l'angiogenèse *in vivo*.

**Figure 8:** Vue générale des différents événements biologiques impliqués dans la formation des métastases.

**Figure 9:** Incidence (pour 100 000) et mortalité du cancer du foie par classe d'âge dans le monde.

**Figure 10:** Incidence du cancer du foie chez l'homme dans le monde.

**Figure 11:** Evolution du nombre de cas (barres) de cancer du foie et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbes, échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2010 en France.

**Figure 12:** Effet de l'alcool sur la carcinogenèse hépatique.

**Figure 13:** Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse induite par la protéine X du VHB.

**Figure 14:** Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse induites par la protéine de capsid du VHC.

**Figure 15:** Principales voies de signalisation en jeu dans le développement du carcinome hépatocellulaire.

**Figure 16:** Voies de signalisation de l'angiogenèse.

**Figure 17:** Thérapies ciblées disponibles ou en développement pour le traitement du CHC et cibles moléculaires visées.

**Figure 18:** Acteurs cellulaires majeurs des réponses immunitaires innée et adaptative et leurs fonctions vis-à-vis d'une cellule tumorale.

**Figure 19:** Structure du récepteur des cellules T (TCR).

**Figure 20:** Reconnaissance par le TCR des antigènes présentés par les molécules CMH.

**Figure 21:** Mécanismes d'échappement tumoral à la lyse spécifique.

**Figure 22 :** Mécanisme de présentation de l'antigène par la molécule CMH-I.

**Figure 23 :** Représentation schématique des points d'actions potentiels des anticorps monoclonaux.

**Figure 24 :** Génération de lymphocytes T anti-tumoraux pour le transfert adoptif.

**Figure 25 :** Fusion de cellules dendritiques et de cellules tumorales autologues.

**Figure 26 :** Représentation schématique de l'induction d'une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre la tumeur suite à une vaccination avec un vecteur viral exprimant un antigène tumoral.

**Figure 27 :** Amplification de la réponse T antigène spécifique dans des protocoles de prime-boost homologue (A) et hétérologue (B) avec des vecteurs viraux.

**Figure 28 :** Cellules immunitaires présentes dans un foie sain.

**Figure 29 :** Cycle répliatif du virus de la vaccine.

**Figure 30 :** Cycle du virus atténué MVA.

**Figure 31 :** Génération de MVA recombinants.

**Figure 32 :** Visualisation de la biodistribution de la souche native du virus de la vaccine (WRluc) et de la souche atténuée (MVA<sub>luc</sub>) par imagerie par bioluminescence après une injection intrapéritonéale (a) ou intramusculaire (b).

**Figure 33 :** Arbre décisionnel du projet.

**Figure 34 :** Représentation schématique du plasmide pCIneomAFP.

**Figure 35 :** Représentation schématique des trois fragments murins de l'AFP.

**Figure 36 :** Etapes schématiques d'obtention des fragments mAFP et dSP mAFP.

**Figure 37 :** Etapes schématiques de l'obtention du fragment « mAFP : TMR ».

**Figure 38 :** Etapes schématiques de l'obtention du fragment « hAFP ».

**Figure 39 :** Etapes schématiques de l'obtention du fragment « hNIS ».

**Figure 40 :** Carte schématique du plasmide de transfert pTG16626.

**Figure 41 :** Récapitulatif des ligations dans le plasmide de transfert.

**Figure 42 :** Représentation schématique des 4 principales étapes de production d'un virus MVA recombinant.

**Figure 43 :** Préparation des cellules embryonnaires de poulet.

**Figure 44 :** Voie de biosynthèse simplifiée du guanylate.

**Figure 45 :** Représentation schématique de la recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le MVA parental.

**Figure 46 :** Observation sous UV des plages de lyse fluorescentes 48 heures après infection des CEP sur milieu gélosé.

**Figure 47 :** Observation sous UV de l'amplification des plages de lyse fluorescentes 72 heures après infection des CEP.

**Figure 48 :** a) Représentation schématique des PCR contrôles réalisées lors de la sélection positive. b) Liste des amorces utilisées.

**Figure 49 :** Représentation schématique de la sélection virale négative par recombinaison homologue.

**Figure 50 :** PCR réalisées pour le contrôle de la sélection négative.

**Figure 51 :** Protocole d'immunisation sur les souris naïves.

**Figure 52 :** Protocole d'immunisation par prime-boost sur les souris naïves.

**Figure 53 :** Protocole d'immunisation avec déplétion des lymphocytes T régulateurs.

**Figure 54 :** Représentation schématique du tri cellulaire réalisé pour isoler les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

**Figure 55 :** Représentation schématique de la librairie de peptides générée pour l'AFP murine.

**Figure 56 :** Représentation schématique des pools de peptides constitués.

**Figure 57 :** Représentation schématique du test Elisa élaboré pour détecter la présence d'anticorps anti-AFP.

**Figure 58 :** Vue de la veine porte dégagée pour réaliser une injection intraportale de cellules tumorales.

**Figure 59 :** Protocole d'immunisation sur le modèle DEN.

**Figure 60 :** Contrôle par western-blot de l'expression de l'AFP murine sécrétée, intracellulaire et de l'AFP humaine.

**Figure 61 :** Contrôle par western-blot de l'expression de l'AFP murine transmembranaire.

**Figure 62 :** Visualisation par immunofluorescence anti-AFP des différentes formes de l'AFP exprimées par les MVA recombinants.

**Figure 63 :** Immunofluorescence dirigée contre le symporteur NIS dans des cellules Hela infectées par le MVA hNIS.

**Figure 64 :** Coupe tomographique d'une observation au confocal de cellules Hela infectées par MVA hNIS et marquées par immunofluorescence anti-NIS.

**Figure 65 :** Incorporation d'iode *in vitro* par différents types cellulaires infectés par le MVA hNIS.

**Figure 66 :** Pourcentage d'incorporation de la dose totale de radioactivité après infection par le MVA hNIS de différents types cellulaires.

**Figure 67 :** Recherche d'un peptide immunodominant de l'AFP murine.

**Figure 68 :** Comparaison de la réponse immunitaire obtenue en test Elispot en fonction du nombre d'immunisations.

**Figure 69 :** Comparaison de la réponse immunitaire obtenue en test Elispot en fonction du MVA recombinant utilisé.

**Figure 70 :** Effet d'un protocole de prime boost sur la réponse immunitaire spécifique de l'AFP.

**Figure 71 :** Effet d'une déplétion en lymphocytes T régulateurs sur la réponse immunitaire obtenue en test Elispot.

**Figure 72 :** Détection de lymphocytes T spécifiques du peptide 1 de l'AFP par marquage tétramères.

**Figure 73 :** Réponses spécifiques de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.

**Figure 74 :** Analyse matricielle pour l'identification des peptides dans le contexte de la recherche de peptides immunodominants pour le fond H2K-k.

**Figure 75 :** Réponses spécifiques de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.

**Figure 76 :** Réponses spécifiques de la fraction non CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.

**Figure 77 :** Présentation théorique des peptides immunodominants.

**Figure 78 :** Comparaison de la réponse spécifique des splénocytes de souris C3H/HeN immunisées avec les différents vecteurs MVA après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.

**Figure 79 :** Analyse matricielle pour l'identification des peptides dans le contexte de la recherche de peptides immunodominants pour le fond H2K-k.

**Figure 80 :** Réponses spécifiques des splénocytes de trois souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.

**Figure 81 :** Réponses spécifiques des splénocytes de souris C57BL/6J immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.

**Figure 82 :** Analyse de la réponse spécifique des splénocytes de trois souris C57BL/6J immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.

**Figure 83 :** Titre en anticorps anti-AFP en fonction du vecteur d'immunisation et de la dilution (1/50, 1/250, 1/1000).

**Figure 84 :** Suivi du titre en anticorps anti-AFP au cours du protocole d'immunisation à la dilution sérique 1/50<sup>ème</sup>.

**Figure 85 :** Détermination du titre en anticorps anti-AFP chez une souris de 2 mois ½ après la dernière immunisation MVA mAFP:TMR.

**Figure 86 :** Effet thérapeutique dans un modèle orthotopique.

**Figure 87 :** Protocole d'immunisation sur le modèle de CHC chimiquement induit.

**Figure 88 :** Comparaison des ratios de poids.

**Figure 89 :** Comparaison du nombre de nodules hépatiques.

**Figure 90 :** Comparaison de la surface tumorale.

**Figure 91 :** Coloration X-gal de différents organes injectés par voie intramusculaire (muscle) ou intrapéritonéale (foie et poumon) et récupérés à des temps variable après l'injection d'un MVA  $\beta$ galactosidase.

**Figure 92 :** Evaluation de l'effet thérapeutique de différents protocoles d'immunisation dans le modèle DEN.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Estimation (2008) ou prévision du nombre (millions) de cas de cancer et de décès, sexes et cancers confondus selon le découpage de l'organisation mondiale de la santé.

**Tableau 2 :** Facteurs comportementaux considérés comme cancérologènes chez l'homme par l'agence internationale pour la recherche contre le cancer.

**Tableau 3 :** Facteurs biologiques considérés comme cancérologènes par l'IARC.

**Tableau 4 :** Réduction potentielle maximale des différentes causes du cancer dans le monde.

**Tableau 5 :** Nombre de cas de cancer du foie en 2010 en France par classe et par sexe.

**Tableau 6 :** Majeures mutations identifiées dans les CHC.

**Tableau 7 :** Utilisation clinique des cytokines chez des patients atteints de cancer.

**Tableau 8 :** Mécanismes d'échappement des tumeurs hépatiques.

**Tableau 9 :** Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant les cellules dendritiques.

**Tableau 10 :** Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant des plasmides ADN.

**Tableau 11 :** Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant des vecteurs adénoviraux seuls ou associés dans des approches de prime-boost à des vecteurs ADN.

**Tableau 12 :** Etudes pré-cliniques basés sur la présentation protéique ou peptidique de l'AFP.

**Tableau 13 :** Dénomination et séquence peptidique des 4 peptides immunodominants de l'AFP humaine décrits pour le contexte HLA-A-0201.

**Tableau 14 :** MVA recombinants exprimant des antigènes associés aux tumeurs actuellement en essais cliniques.

**Tableau 15 :** Descriptif des plasmides utilisés au cours du projet.

**Tableau 16 :** Mutations ponctuelles dans la séquence humaine du symporteur NIS utilisée par comparaison avec la séquence théorique de NCBI.

**Tableau 17 :** Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

**Tableau 18 :** Constructions plasmidiques réalisées.

**Tableau 19 :** Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western Blots.

**Tableau 20 :** Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western Blots.

**Tableau 21 :** Titres viraux des MVA recombinants produits aux différentes étapes de production.

**Tableau 22 :** Poids moléculaires attendus pour les différentes protéines recherchées.

## Préambule

J'ai réalisé mon doctorat dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société Transgene. Mon travail de thèse principal porte sur l'évaluation de la faisabilité d'une approche d'immunothérapie du carcinome hépatocellulaire avec des vecteurs MVA recombinants exprimant l'alpha-fœtoprotéine dans le modèle murin. Ce manuscrit présente le contexte scientifique du sujet, sa problématique ainsi que les résultats obtenus et les perspectives à envisager.

Au cours de ces trois années, j'ai également eu l'opportunité de travailler au sein de l'unité Inserm U948 de Biothérapies hépatiques au CHU de Nantes. J'ai, à cette occasion, pu m'investir sur des thématiques développées au sein de ce laboratoire. De ce fait, j'ai participé à des projets d'imagerie chez le petit animal, imagerie classique par bioluminescence ou plus originale par PET ou SPECT. Les objectifs de ces travaux sont de visualiser la biodistribution de vecteurs viraux *in vivo* après injection chez la souris et de déterminer la durée d'expression de transgènes exprimés par ces vecteurs. Un protocole d'imagerie *in vivo* par PET basé sur l'utilisation du symporteur NIS en tant que gène rapporteur a été rédigé pour une édition dans Humana Press et est présenté dans l'annexe B.

J'ai, d'autre part, travaillé sur un projet visant à déterminer si l'infection des glandes surrénales par l'adénovirus de type 5 est un processus dépendant ou au contraire indépendant du récepteur coxsackievirus-adénovirus (CAR) et dans ce cas, si l'entrée du vecteur viral est gouverné par les facteurs sanguins. Ce travail est présenté dans l'annexe C.

## SOMMAIRE

<b>I. Introduction générale .....</b>	<b>20</b>
<b>A. Généralités sur les cancers .....</b>	<b>20</b>
1. Statistiques du cancer .....	20
2. Etiologies du cancer .....	22
a) Autonomie vis-à-vis des facteurs de croissance .....	29
b) Echappement au contrôle des inhibiteurs de croissance.....	30
c) Capacité d'angiogenèse .....	31
d) Capacité invasive.....	33
e) Acquisition de résistance à l'apoptose .....	35
3. Traitements conventionnels du cancer .....	35
a) La chirurgie .....	36
b) La chimiothérapie.....	37
c) La radiothérapie.....	38
<b>B. Le carcinome hépatocellulaire .....</b>	<b>39</b>
1. Epidémiologie du carcinome hépatocellulaire .....	39
2. Facteurs de risque pour le CHC.....	42
a) Cirrhose .....	42
b) Infection virales par les virus de l'hépatite B et C .....	44
(1) Le virus de l'hépatite B (VHB) .....	44
(2) Le virus de l'hépatite C (VHC) .....	47
c) Infection par les aflatoxines.....	48
d) Autres facteurs.....	49
3. Caractéristiques du carcinome hépatocellulaire .....	50
a) Données cliniques, morphologiques et histologiques.....	50
b) Classification clinique du CHC .....	51
c) Mécanismes moléculaires du CHC .....	52
(1) Implications pour l'angiogenèse du CHC .....	53
(2) Voies induites par EGFR, IGF et HGF .....	54
(3) Voie RAF/MEK/ERK .....	55
(4) Voie PI3K/AKT/mTOR .....	56

(5) Voie WNT/ $\beta$ -caténine .....	57
d) Classification moléculaire du CHC .....	57
4. Diagnostic et prise en charge du CHC .....	59
a) Diagnostic.....	59
b) Traitements.....	60
(1) Curatifs .....	61
(a) Chirurgicaux.....	61
(b) Non chirurgicaux.....	62
(2) Adjuvants.....	63
(3) Palliatifs.....	64
(4) Préventifs.....	66
<b>C. Immunothérapie des cancers par des stratégies de vaccination génétique.....</b>	<b>67</b>
1. Concepts fondamentaux de l'immunothérapie des cancers.....	68
a) Acteurs de l'immunité anti-tumorale.....	68
b) Rationnels de l'immunothérapie des cancers .....	69
(1) L'immunosurveillance.....	69
(2) Les antigènes associés aux tumeurs .....	70
(3) Les obstacles de l'immunothérapie .....	72
(a) Les mécanismes inhérents aux cellules tumorales .....	73
(b) Rôle du microenvironnement tumoral.....	75
(c) Tolérance du système immunitaire.....	75
2. Stratégies de l'immunothérapie des cancers.....	77
a) Immunothérapie passive.....	77
b) Immunothérapie active ou vaccination.....	81
c) Stratégies pour favoriser une réponse immunitaire .....	82
3. Cas de la vaccination génétique .....	84
a) Vecteurs de l'immunothérapie des cancers .....	85
(1) Vecteurs non viraux.....	85
(a) ADN nu .....	85
(b) Vecteurs synthétiques.....	86
(2) Vecteurs viraux.....	87
(a) Adénovirus .....	88
(b) Herpes simplex virus .....	89

(c) Poxvirus.....	89
b) Optimisation des protocoles de vaccination génique .....	90
c) Aperçu des essais cliniques .....	93
<b>D. Carcinome hépatocellulaire et immunothérapie active spécifique d'un antigène. 95</b>	
1. Rationnel du traitement du CHC par immunothérapie active .....	95
2. Les antigènes tumoraux du CHC.....	96
a) Antigènes de type oncotesticulaires .....	96
b) Antigènes oncofoetaux .....	97
c) Antigènes oncoviraux.....	99
d) Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs .....	99
e) Antigènes surexprimés .....	99
3. Présentation antigénique du foie .....	99
4. Obstacles à l'immunothérapie du CHC.....	102
5. Modèles d'études du CHC .....	104
6. Essais pré-cliniques et cliniques basés sur l'AFP.....	106
a) Etudes pré-cliniques .....	106
b) Essais cliniques.....	111
<b>E. Utilisation des MVA dans des protocoles d'immunothérapie du cancer ..... 113</b>	
1. Caractéristiques et obtention des MVA.....	113
a) Origine de la souche MVA.....	113
b) Cycle viral du MVA .....	114
c) MVA recombinants .....	116
2. Biodistribution, ciblage et mode d'action <i>in vivo</i> .....	117
3. Essais d'immunothérapies pré-cliniques et cliniques basés sur l'utilisation du MVA.....	119
a) Essais pré-cliniques.....	119
b) Essais cliniques .....	120

<b>II. Présentation du projet de thèse .....</b>	<b>124</b>
<b>A. Présentation et enjeux du projet .....</b>	<b>124</b>
<b>B. Conduite du projet, stratégies et analyses envisagées .....</b>	<b>125</b>
<b>C. Imagerie des vecteurs d'immunisation.....</b>	<b>126</b>
<b>III. Matériel et méthodes.....</b>	<b>128</b>
<b>A. Construction moléculaire des vecteurs MVA .....</b>	<b>128</b>
1. Obtention des séquences nucléotidiques d'intérêt.....	128
a) PCR .....	132
b) Purification des produits PCR .....	134
c) Digestions enzymatiques .....	134
2. Clonage des séquences d'intérêt dans le plasmide de transfert .....	134
a) Ouverture du plasmide de transfert .....	135
b) Ligation .....	136
c) Transformation .....	137
<b>B. Production des vecteurs viraux MVA recombinants.....</b>	<b>139</b>
1. Préparation des cellules embryonnaires de poulet.....	139
a) Extraction des embryons de poulet.....	139
b) Digestion des embryons .....	140
c) Mise en culture des CEP.....	140
2. Transfert .....	141
a) Infection par le virus parental.....	141
b) Transfection avec le plasmide de transfert .....	141
3. Sélection positive .....	142
a) Premier sous-clonage .....	143
b) Récupération de plage de lyse .....	143
c) Amplification des plages de lyse .....	144
d) Contrôle de la sélection par PCR.....	144
e) Cycles suivants de sous-clonage .....	147

f) Constitution d'un stock viral GPT+ .....	147
4. Sélection négative.....	148
5. Purification .....	150
6. Vérification de l'expression du transgène <i>in vitro</i> .....	151
a) Western Blot.....	151
b) Immunofluorescence .....	152
(1) Mise en évidence de l'AFP.....	152
(2) Mise en évidence de NIS .....	152
c) Test de captation d'iode .....	153
<b>C. Evaluation de la réponse immunitaire .....</b>	<b>154</b>
1. Protocole d'immunisation <i>in vivo</i> .....	154
2. Analyse de la réponse cellulaire .....	155
a) Elispot.....	155
b) Recherche de peptides immunodominants .....	157
c) Analyse par tétramères .....	158
3. Analyse de la réponse humorale.....	158
a) Prélèvement sanguin.....	158
b) Elisa.....	159
4. Analyse de l'effet thérapeutique.....	160
a) Protocole dans le modèle orthotopique .....	160
b) Protocole dans le modèle chimiquement induit.....	161
<b>D. Suivi de la biodistribution <i>in vivo</i>.....</b>	<b>162</b>
1. Marquage colorimétrique .....	162
2. Imagerie SPECT-CT .....	162
<b>IV. Résultats des travaux .....</b>	<b>164</b>
<b>A. Productions des MVA recombinants.....</b>	<b>164</b>
1. Bilan des MVA recombinant produits.....	164
2. Contrôle <i>in vitro</i> des MVA recombinants .....	164
a) Contrôle de l'expression protéique par western blot.....	164
b) Contrôle de l'expression protéique par immunofluorescence .....	167

c)	Contrôle de la fonctionnalité de MVA hNIS .....	169
<b>B.</b>	<b>Analyse de la réponse cellulaire .....</b>	<b>172</b>
1.	Analyse de la réponse spécifique des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> contre un épitope immunodominant décrit par algorithme .....	172
a)	Résultats antérieurs du laboratoire .....	172
b)	Comparaison du nombre d'injections.....	173
c)	Comparaison des MVA recombinants exprimant l'AFP murine .....	174
d)	Combinaison avec l'adénovirus dans un protocole de prime-boost .....	175
e)	Déplétion de lymphocytes T régulateurs .....	176
f)	Recherche de la population lymphocytaire spécifique de l'AFP par tétramères .....	178
2.	Recherche de peptides immunodominants .....	179
a)	Dans un contexte CMH-I.....	180
(1)	Sélection de pools et identification de peptides.....	180
(2)	Evaluation des peptides individuels .....	182
b)	Dans un contexte CMH-I et CMH-II.....	184
(1)	Dans un fond génétique H2K-k.....	184
(2)	Dans un fond génétique H2K-b.....	187
<b>C.</b>	<b>L'immunisation induit une réponse humorale .....</b>	<b>190</b>
1.	Suivi du titre en anticorps sur un protocole court d'immunisation .....	190
a)	Recherche d'anticorps spécifique de l'AFP .....	190
b)	Suivi du titre en anticorps lors d'un protocole court d'immunisations .....	191
2.	Détermination du titre en anticorps sur un protocole long d'immunisation.....	191
<b>D.</b>	<b>Effet thérapeutique .....</b>	<b>192</b>
1.	Sur le modèle orthotopique .....	192
2.	Sur le modèle chimiquement induit.....	193
<b>E.</b>	<b>Biodistribution du vecteurs MVA hNIS.....</b>	<b>196</b>
1.	Suivi indirect par marquage X-gal .....	196
2.	Suivi direct par SPECT .....	197
<b>V.</b>	<b>Discussion générale et conclusion.....</b>	<b>199</b>

**VI. Annexes**

<b>ANNEXE A : .....</b>	<b>208</b>
<b>Effet thérapeutique d'une immunothérapie spécifique de l'AFP dans un modèle de CHC murin. ....</b>	<b>208</b>
<b>ANNEXE B : .....</b>	<b>209</b>
<b>Protocole d'imagerie <i>in vivo</i> par PET-SCAN basé sur l'utilisation du symporteur NIS comme gène rapporteur.....</b>	<b>209</b>
<b>ANNEXE C : .....</b>	<b>210</b>
<b>Infection des glandes surrénales par les adénovirus de type 5.....</b>	<b>210</b>

**Bibliographie**

# Introduction Générale

## I. Introduction générale

### A. Généralités sur les cancers

Le cancer n'est pas une pathologie moderne et de nombreux éléments, décrits dans les textes anciens ou même observés sur des restes fossiles, en témoignent. Cependant, cette maladie devient plus courante qu'auparavant, à cause de la croissance globale de la population mondiale et de l'augmentation de la durée de vie des hommes. L'enjeu considérable en terme de santé publique fait de cette pathologie une des maladies les plus étudiées à l'heure actuelle.

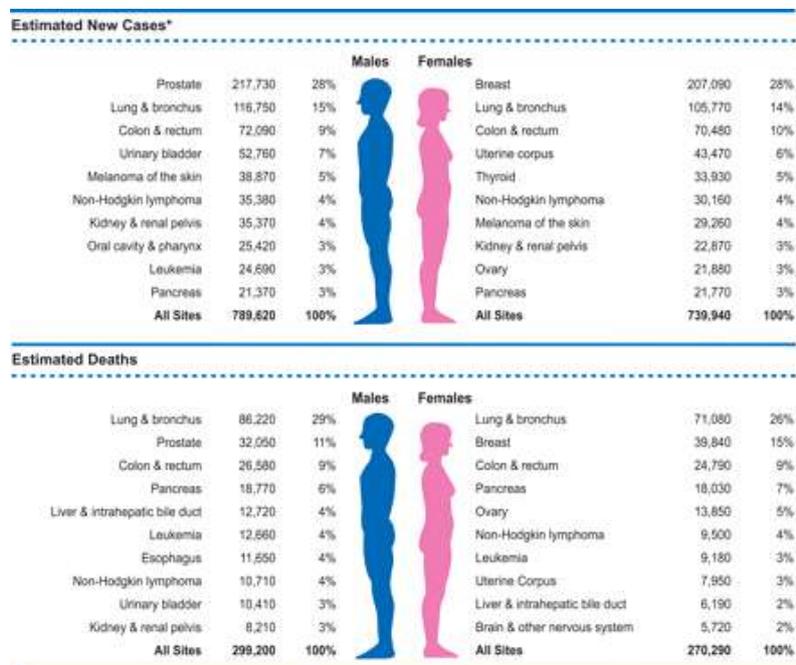
#### 1. Statistiques du cancer

En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter le cancer et malgré les progrès de la médecine et des traitements, les chiffres du cancer restent alarmants. Les statistiques internationales estimaient, en 2008 dans le monde, à 12,7 millions le nombre de nouveaux cas de cancers déclarés et à 7,6 millions le nombre de décès par cancer pour une population mondiale estimée à 6,7 milliards (Ferlay et al., 2010). La population mondiale devrait atteindre environ 8,3 milliards en 2030 avec une croissance estimée à 38% dans les pays sous-développés et à 4% dans les pays développés. La tranche de population la plus touchée par le cancer correspond aux personnes âgées, or, d'ici 2030, la proportion de gens de plus de 65 ans devrait également s'accroître. Ainsi, sans modification des courbes de tendance actuelle, le cancer pourrait tuer environ 13 millions de personnes en 2030 et ce chiffre pourrait s'élever à 17 millions en envisageant un taux annuel de progression de la maladie de 1% (2008) (**Tableau 1**).

Région	2008		2030 <sup>1</sup>		2030 <sup>2</sup>	
	Cas	Décès	Cas	Décès	Cas	Décès
Monde	12,4	7,6	20,0	12,9	26,4	17,0
Afrique	0,7	0,5	1,2	0,9	1,6	1,3
Europe	3,4	1,8	4,1	2,6	5,5	3,4
Est Méditerranéen	0,5	0,3	0,9	0,6	1,2	0,9
Pan-America	2,6	1,3	4,8	2,3	6,4	3,1
Asie du Sud Est	1,6	1,1	2,8	1,9	3,7	2,6
Pacifique Ouest	3,7	2,6	6,1	4,4	8,1	5,9

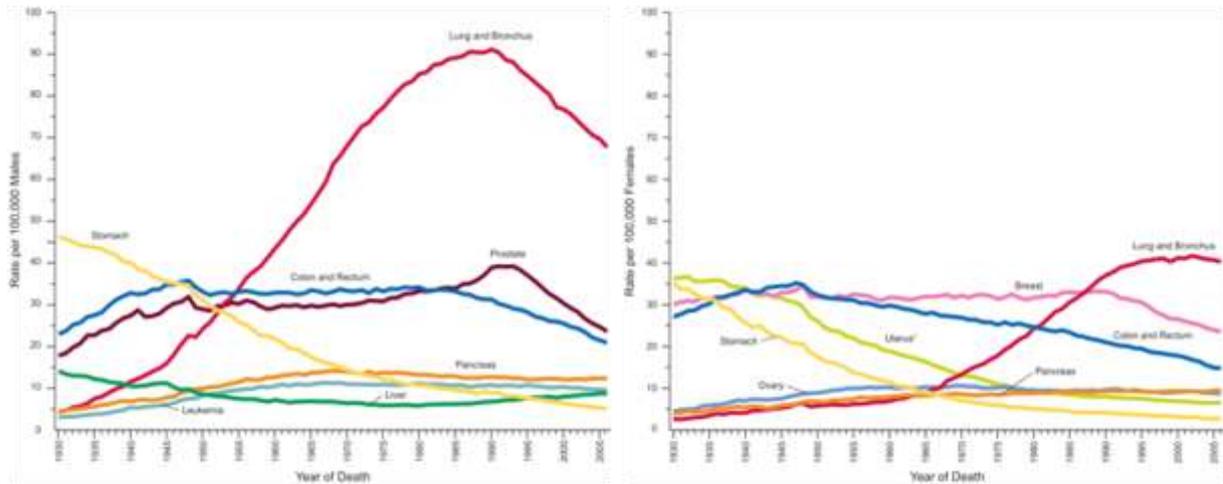
**Tableau 1 : Estimation (2008) ou prévision du nombre (millions) de cas de cancer et de décès, sexes et cancers confondus selon le découpage de l'organisation mondiale de la santé.** <sup>1</sup> sans modifications des courbes de tendance, <sup>2</sup> avec un taux annuel de progression de la maladie de 1%. (2008).

Les cancers les plus diagnostiqués dans le monde sont les cancers du poumon (1,61 million de cas soit 12,7% des cancers totaux), les cancers du sein (1,38 million soit 10,9% des cancers totaux) et les cancers colorectaux (1,23 million soit 18,2% des cancers totaux) (Ferlay et al., 2010). En 2010, aux Etats-Unis, les cancers les plus diagnostiqués sont chez les hommes, le cancer de la prostate (28%), le cancer du poumon (15%) et le cancer colorectal (9%) et chez les femmes, le cancer du sein (28%), le cancer du poumon (14%) et le cancer colorectal (10%) (**Figure 1**). Du fait du mauvais pronostic, le cancer du poumon est également le cancer le plus mortel (1,38 million soit 18,2% de la mortalité globale due à un cancer), suivi du cancer de l'estomac (738 000 morts soit 9,7% du total) et du cancer du foie (696 000 morts soit 9,2% du total) (Ferlay et al., 2010).



**Figure 1 : Estimation des dix cancers les plus diagnostiqués et les plus mortels par sexe aux Etats-Unis en 2010.** (Jemal et al., 2010).

En tant que problème majeur de santé publique, le cancer fait l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. Les objectifs sont de prévenir et de limiter l'exposition aux facteurs de risque ainsi que de dépister plus précocement la maladie pour mieux la soigner. Ces actions associées aux progrès médicaux conduisent au recul de l'incidence des quatre principaux cancers, excepté le cancer du poumon chez la femme ainsi qu'au recul de la mortalité associée (**Figure 2**).



**Figure 2 : Evolution annuelle du taux de mortalité associé à certains types de cancers en fonction du sexe aux Etats-Unis entre 1930 et 2006. (Jemal et al., 2010).**

En effet, le taux de mortalité pour l'ensemble des cancers a diminué de 2% par an entre 2001 et 2006 pour les hommes et de 1.5% pour les femmes entre 2002 et 2006, comparé à des diminutions de 1.5% par an chez les hommes entre 1993 et 2001 et 0.8% par an chez les femmes entre 1994 et 2002 (Jemal et al., 2010).

## 2. Etiologies du cancer

La première étape de la prévention consiste à identifier clairement les causes de la survenue des cancers chez l'homme. Parmi 900 agents évalués ou réévalués depuis 1970 par l'IARC (agence internationale pour la recherche contre le cancer), 108 ont clairement été identifiés comme cancérogènes pour l'homme (groupe 1), 64 sont probablement cancérogènes pour l'homme (groupe 2A) et 240 sont peut être cancérogènes pour l'homme (groupe 2B).

Les causes du cancer sont multiples et peuvent ainsi être :

- chimiques : de nombreux composés chimiques retrouvés dans notre environnement comme le benzène dans les solvants (Khalade et al., 2010), le chlorure de vinyle dans l'élaboration du PVC (Ji et al., 2010), l'amiante dans les bâtiments anciens (Kamp, 2009) par exemple sont connus comme pouvant induire des cancers ;
- comportementales : le tabagisme (Gandini et al., 2008), l'alcoolisme (Boffetta and Hashibe, 2006), l'exposition excessive aux UV ou au soleil sont également en cause dans la genèse de certains cancers (**Tableau 2**) ;

<b>Facteurs</b>	<b>Cancers associés</b>
Tabagisme	Poumons, vessie, œsophage, bouche, larynx, rein, pancréas, foie, autres
Tabagisme passif	Poumons
Alcool	Œsophage, larynx, bouche, pharynx, foie, sein
Radiation ionisante	Moelle osseuse and potentiellement d'autres sites
Radiation UV	Peau, lèvres

**Tableau 2 : Facteurs comportementaux considérés comme cancérigènes chez l'homme par l'agence internationale pour la recherche contre le cancer.** (Lagiou et al., 2005).

- alimentaires : il y a actuellement de nombreuses controverses pour déterminer si tel ou tel aliment a un effet bénéfique ou néfaste pour le développement de tel ou tel cancer. De façon générale, une alimentation trop salée ou une consommation fréquente d'aliments fumés favoriseraient le développement de cancers gastriques (Tsugane, 2005). D'autre part, une consommation excessive de graisse favoriserait la survenue du cancer du sein (Chajes et al., 2008). De plus, le surpoids peut également favoriser les adénocarcinomes, de l'œsophage notamment (Renehan et al., 2008) ;

- rayonnantes : tous les rayonnements, de par leurs effets mutationnels, peuvent entraîner des cancers. L'exposition à des radiations naturelles ou d'origine industrielle, médicale ou autre peut par exemple favoriser la survenue de leucémies, de cancers du sein ou de la thyroïde (Cardis et al., 2005). Vingt ans après l'accident nucléaire de Tchernobyl, les estimations prévoient la déclaration de 16 000 cas de cancer de la thyroïde et 25 000 cas d'autres cancers en Europe d'ici 2065 directement liés à cette catastrophe (Cardis et al., 2006). Actuellement, de nombreuses études sont en cours pour évaluer les risques éventuels engendrés par les radiations émises par les téléphones portables sur la survenue de cancers tels que la leucémie par exemple ;

- génétiques : dans certains cas, rares, une susceptibilité génétique au cancer a été démontrée. Certaines altérations génétiques touchant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs confèrent un risque accru de survenue de cancer. Ces gènes impliqués dans les cancers dits « héréditaires » du colon ou du sein par exemple sont désormais bien connus et peuvent faire l'objet de tests génétiques (Hampel, 2009; Mavaddat et al.) ;

- hormonales : de nombreuses études démontrent l'implication des hormones endogènes ou exogènes, notamment des stéroïdes sexuels et des facteurs de croissance, dans l'étiologie et le développement des cancers notamment du sein (Key et al., 2001; Key et al., 2010) et des ovaires (Beral et al., 2007) ;

- biologiques : Quinze à vingt pour cent des cancers dans le monde sont attribués à des agents biologiques, principalement des virus (responsables de 15% des cancers humains) mais aussi des mycotoxines, des bactéries et des parasites (**tableau 3**) (Kalland et al., 2009; Lagiou et al., 2005).

Facteurs	Cancers associés
<i>Aspergillus flavus</i> (aflatoxines)	Foie
Virus de l'hépatite B (HBV)	Foie
Virus de l'hépatite C (HCV)	Foie
<i>Helicobacter pylori</i>	Estomac
<i>Schistosoma hematobium</i>	Vessie
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Cholangiosarcome
<i>Clonorchis sinensis</i>	Cholangiosarcome
Papillomavirus humain (HPV)	Utérus, anus
Herpes simplex virus-8 (HSV-8)	Sarcome de Kaposi
Virus de l'immunodéficience acquise humaine-1 (HIV-1)	Lymphome Non-Hodgkinien, sarcome de Kaposi, anus
Virus T-lymphotrophique humain-1 (HTLV-1)	Leucémie
Virus d'Epstein-Barr	Cancers lymphoprolifératifs, nasopharynx

**Tableau 3 : Facteurs biologiques considérés comme cancérogènes par l'IARC.** (Lagiou et al., 2005).

Alors que certains de ces agents biologiques (HPV, EBV, HTLV-1, HSV8) jouent un rôle direct dans la carcinogenèse via des oncoprotéines, d'autres ont un effet indirect soit en induisant une inflammation chronique avec une nécrose des tissus (VHB, VHC, *H. pylori*), soit en affectant l'immunité de l'hôte. Durant les deux dernières décennies, de nombreuses stratégies visant à limiter l'infection par ces agents biologiques cancérogènes ont été développées conduisant notamment à une thérapie antibiotique contre *H. pylori* et à des vaccins prophylactiques contre le VHB (Shepard et al., 2006) et le papillomavirus humain (Ault, 2007; Paavonen et al., 2009).

Les étiologies variées du cancer donnent la possibilité d'agir sur différents fronts pour réduire l'incidence de la pathologie (**tableau 4**). Les grands axes d'action et de prévention portent sur la lutte contre le tabagisme, la prévention des cancers environnementaux et professionnels, la prévention liée à l'alimentation et à l'activité physique ainsi que sur le dépistage et la vaccination pour les cancers d'origine infectieuse.

<b>Facteurs ou catégories de facteurs</b>	<b>Pourcentage</b>
Tabagisme	25
Alcoolisme	3
Régime alimentaire de l'adulte	15
Apport énergétique excédentaire pendant l'enfance	5
Additifs alimentaires et contaminants	1
Vie sédentaire	2
Agents infectieux	15
Facteurs de la reproduction	4
Radiations ionisantes et UV	2
Facteurs environnementaux	5
Pollution	3
Produits médicaux et procédures médicales	2

**Tableau 4 : Réduction potentielle maximale des différentes causes du cancer dans le monde.** (Lagiou et al., 2005).

### 3. Mécanismes conduisant à l'établissement du cancer

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.

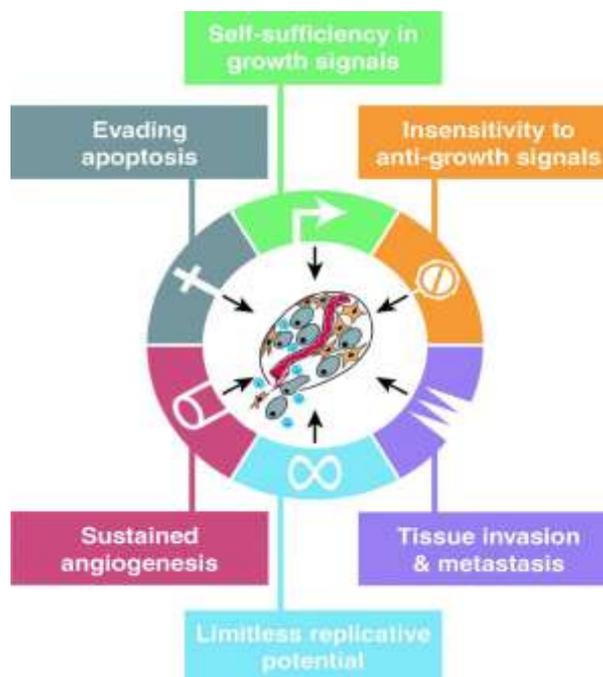
De nombreux travaux montrent que la tumorigenèse chez l'homme est un processus nécessitant plusieurs étapes au cours desquelles les cellules subissent une succession de changements métaboliques et génétiques conduisant à la conversion progressive d'une cellule normale en cellule tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000; Seyfried and Shelton, 2010). La recherche scientifique a permis de générer une quantité considérable de données sur les altérations génétiques en jeu dans le processus de tumorigenèse.

Ainsi, la conversion d'une cellule normale en une cellule tumorale survient consécutivement à l'accumulation de modifications du programme génétique contrôlant notamment la prolifération des cellules via l'expression d'oncogènes (Bishop, 1996) et/ou la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs (Hainaut and Hollstein, 2000), la durée de vie des cellules, leur relation avec les cellules environnantes et leur capacité à échapper au contrôle du système immunitaire. Ce processus conduit à la mise en place d'un ensemble dérégulé de cellules qui ne suivent plus les règles régissant la croissance et le comportement des cellules normales. Si la présence de ces cellules anormales peut rester asymptomatique (stade pré-malin) pendant un certain temps, celles-ci vont continuer à proliférer et à accumuler des

modifications jusqu'à perturber les fonctions physiologiques, donnant lieu à l'apparition de multiples symptômes chez le patient dépendants de la localisation et de la taille de la tumeur. La tumeur est alors considérée comme maligne et son évolution peut conduire à la dissémination d'une partie des cellules cancéreuses dans l'organisme formant ainsi les métastases.

Hanahan et Weinberg ont proposé, en 2000, six altérations essentielles à la progression tumorale qui pourraient être communes à la plupart voire à toutes les tumeurs humaines (**figure 3**) :

- Acquisition d'un potentiel de réplication illimité
- Emission endogène de facteurs de croissance
- Echappement au contrôle des inhibiteurs de croissance
- Capacité d'angiogenèse
- Capacité invasive
- Acquisition de la résistance à l'apoptose



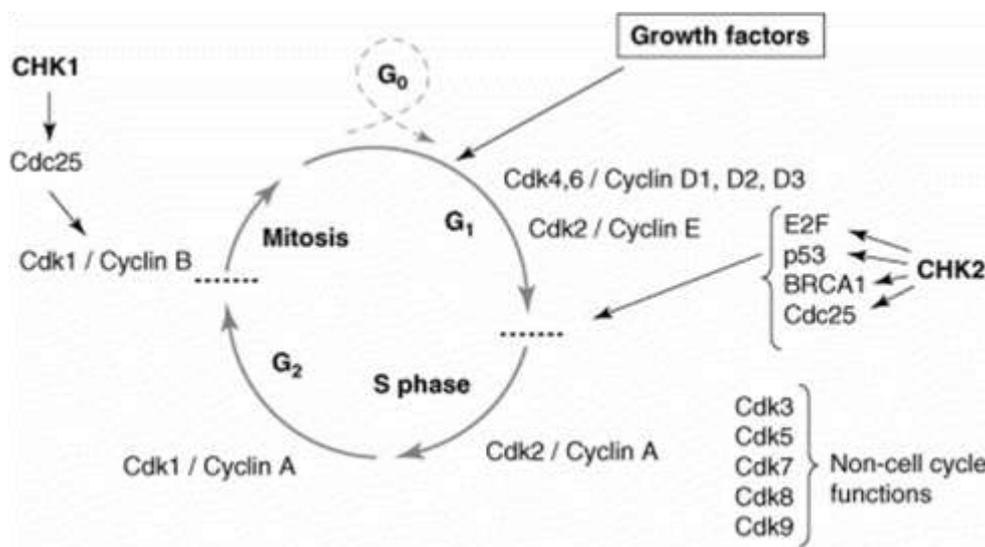
**Figure 3 : Capacités acquises par les cellules tumorales pour assurer leur développement.** (Hanahan and Weinberg, 2000).

Ces altérations interviendraient collectivement dans la tumorigenèse et de ce fait, les multiples possibilités de défense de l'organisme aux différents niveaux pourraient expliquer la faible survenue des cancers au cours de la première moitié de vie de l'homme.

a) *Acquisition d'un potentiel de réplication illimité*

Deux éléments distincts permettent l'acquisition par les cellules cancéreuses d'un potentiel de réplication illimité. Le premier consiste en l'altération de gènes contrôlant le déroulement du cycle cellulaire. Le deuxième résulte de la mise en place de mécanismes visant à lever l'entrée en sénescence des cellules, c'est-à-dire à empêcher leur arrêt permanent de prolifération.

Le contrôle de la division cellulaire est critique pour le maintien de la structure et de la fonction d'un tissu normal. Ce contrôle est assuré par un ensemble complexe de régulations mettant en jeu de nombreux gènes contrôlant notamment les deux étapes clés du cycle cellulaire, à savoir la réplication de l'ADN (phase S) et la mitose (phase M) (**figure 4**).



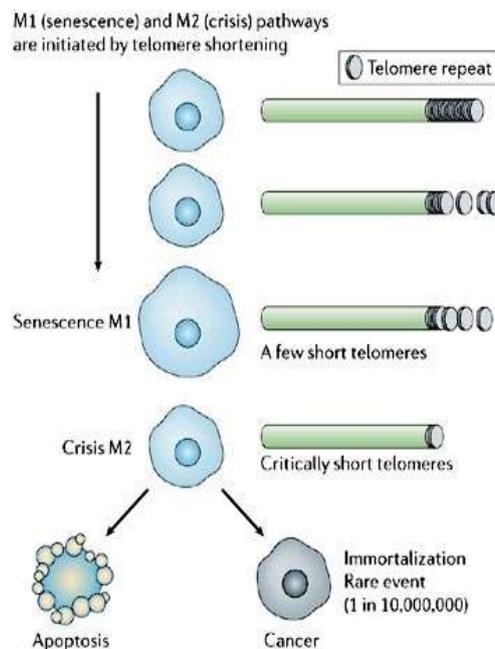
**Figure 4 : Cycle cellulaire et point de contrôle.** (Collins and Garrett, 2005).

Les cyclines, associées à des kinases et à leurs inhibiteurs assurent principalement ce contrôle. Or, les gènes codant ces molécules sont particulièrement sujets aux altérations génétiques observées dans un contexte tumoral. Les altérations touchent deux principaux types de régulateurs :

- les régulateurs impliqués dans la limitation de la progression du cycle cellulaire dont l'inactivation va conduire à une accélération et à une progression incontrôlée du cycle. On peut citer notamment les mutations touchant le gène suppresseur de tumeur p53 qui contrôle la transcription de nombreux inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire intervenant dans les transitions G1/S et G2/M (Hainaut and Hollstein, 2000; Stark and Taylor, 2006). La mutation de p53 est retrouvée dans plus de 50% des cas de cancers ;

- les régulateurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire et dont l'altération entraîne une augmentation de leur activité conduisant à un emballement du cycle. L'oncogène CCND1, codant la cycline D1 responsable de la progression vers la phase G1, est localisé dans une région surexprimée dans 10 à 40% des carcinomes (Santamaria and Ortega, 2006).

D'autre part, les travaux de Hayflick et al. ont démontré que les cellules pouvaient seulement se répliquer une cinquantaine de fois avant d'entrer en sénescence (Hayflick, 1980). Des recherches ultérieures ont apporté la démonstration que l'érosion des télomères au cours de chaque division conduit progressivement à la mise à nu de l'extrémité du chromosome et à l'entrée de la cellule en sénescence ou en apoptose (**figure 5**).



**Figure 5 : Sénescence et tumorigenèse médiées par les télomères.** (Shay and Wright, 2006).

Afin d'échapper à cette mort programmée, deux mécanismes distincts permettent le maintien des télomères dans les cellules tumorales (Holt and Shay, 1999). Dans 85% des cancers, une sur-expression de la télomérase permet l'ajout de séquences répétées d'hexanucléotides à l'extrémité des chromosomes pour remplacer les séquences perdues au cours de la division cellulaire (Shay and Wright, 2006). Dans 15% des tumeurs humaines cependant, le maintien des télomères repose sur un mécanisme télomérase-indépendant appelé mécanisme alternatif de maintenance des télomères (ALT) basé sur une recombinaison inter-chromosomique (Muntoni and Reddel, 2005). Quelque soit le mécanisme mis en jeu, le maintien de la longueur des extrémités télomériques assure une prolifération illimitée des cellules filles issues de la division.

### *b) Autonomie vis-à-vis des facteurs de croissance*

En l'absence de signaux stimulants, les cellules normales ne peuvent pas proliférer, ce qui explique la nécessité de compléter le milieu de culture de cellules normales avec des facteurs mitogènes et un substrat adéquat pour les intégrines. Ceci contraste fortement avec la dépendance réduite des cellules tumorales aux signaux exogènes de croissance pour leur prolifération.

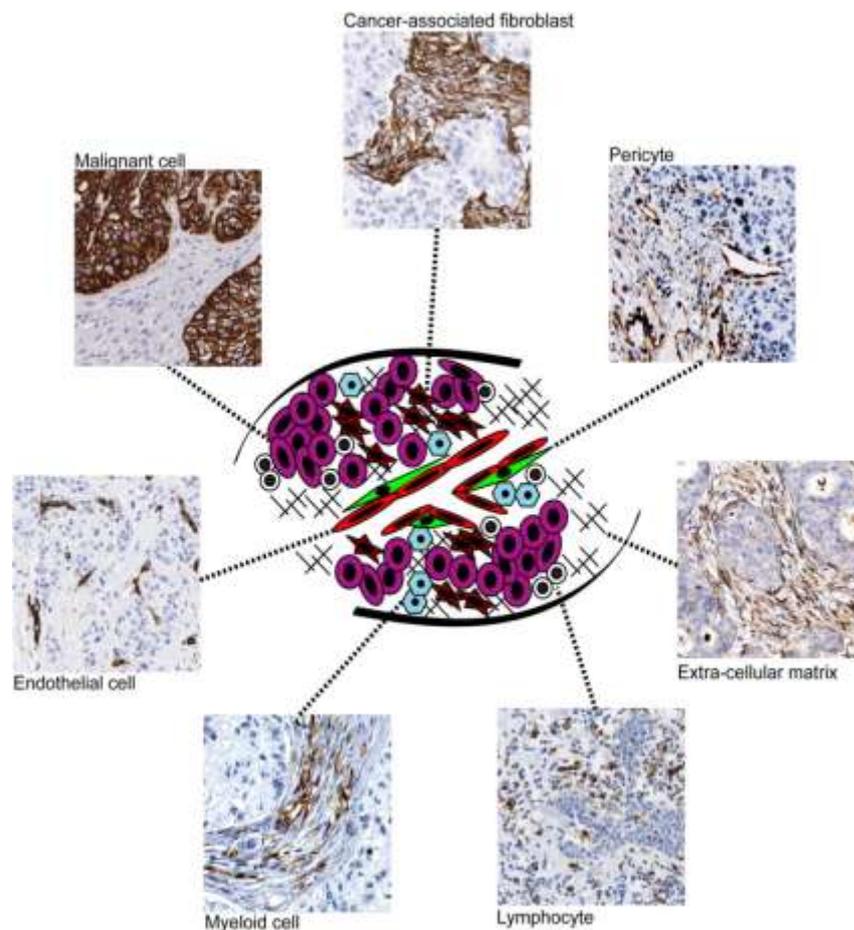
Trois mécanismes contribuent à l'autosuffisance en facteurs de croissance des cellules tumorales: l'altération des signaux de croissance extracellulaire, l'altération des mécanismes de transduction de ces signaux et l'altération des circuits intracellulaires empêchant ainsi l'action du signal (Hanahan and Weinberg, 2000).

Alors que dans un contexte normal, seules certaines cellules émettent des signaux de croissance agissant sur d'autres types cellulaires environnants, de nombreuses cellules tumorales acquièrent la capacité de synthèse de facteurs de croissance auxquels elles sont de plus sensibles, conduisant ainsi à leur stimulation autocrine. Le rôle de PDGF (platelet-derived growth factor) a été ainsi mis en évidence dans le fibrosarcome cutané, dans le développement de gliomes, ainsi que dans la progression de cancers de la prostate et des ovaires (Board and Jayson, 2005). Le blocage de cette stimulation autocrine via le blocage des récepteurs au PDGF constitue d'ailleurs une voie de recherche thérapeutique.

Dans un contexte tumoral, les récepteurs cellulaires de surface des signaux de croissance sont la cible d'altérations fonctionnelles. Ils peuvent notamment être surexprimés conduisant ainsi à une sensibilité des cellules tumorales à des niveaux de facteurs de croissance extrêmement faibles. La surexpression des récepteurs EGF et HER2 est par exemple corrélée à un mauvais pronostic dans le cas de cancer des poumons (Hirsch et al., 2009). De plus, des mutations de ces récepteurs peuvent conduire à l'expression de formes tronquées dont la fonctionnalité va devenir ligand-indépendante (Lonardo et al., 1990).

Le type d'intégrines (récepteurs des molécules de la matrice extracellulaire) exprimées à la surface des cellules tumorales peut également varier de façon à exprimer celles qui permettent le mieux la transmission des signaux de croissance, de résistance à l'apoptose et de sortie de quiescence (Giancotti and Ruoslahti, 1999).

Cependant, la seule stimulation de croissance autocrine n'est pas suffisante pour expliquer le développement tumoral notamment parce que les cellules tumorales n'évoluent pas de façon isolée mais en étroite interaction avec le microenvironnement où de nombreux autres types cellulaires émettent également des signaux paracrines ou endocrines (**figure 6**).



**Figure 6: Vue simplifiée des différents constituants cellulaires d'une tumeur.** (Pietras and Ostman, 2010).

Les fibroblastes du microenvironnement tumoral (CAF) peuvent notamment favoriser la prolifération cellulaire via l'émission de nombreux signaux de croissance, des hormones ou des cytokines. Des facteurs de croissance des hépatocytes (HGF), certains membres de la famille des EGF (epidermal growth factor), des facteurs de croissance des fibroblastes ou des cytokines comme le SDF-1 $\alpha$  (CXCL12) ou l'IL-6 sont en effet fortement exprimés par les CAFs dans différents types de tumeurs (Bhowmick et al., 2004).

### *c) Echappement au contrôle des inhibiteurs de croissance*

Dans un contexte non tumoral, les signaux antiprolifératifs reçus par les cellules assurent le maintien de la quiescence cellulaire et de l'homéostasie tissulaire. Comme les signaux de croissance, les inhibiteurs de croissance peuvent être des facteurs solubles, des

composants de la matrice extracellulaire ou des molécules de surface et la transduction de leur signal se fait via les récepteurs transmembranaires présents sur la cellule cible. Les inhibiteurs de croissance bloquent la prolifération soit en interrompant transitoirement le cycle via une phase transitoire G0 de quiescence, soit de façon permanente en induisant une phase post-mitotique associée à une différenciation phénotypique (Hanahan and Weinberg, 2000).

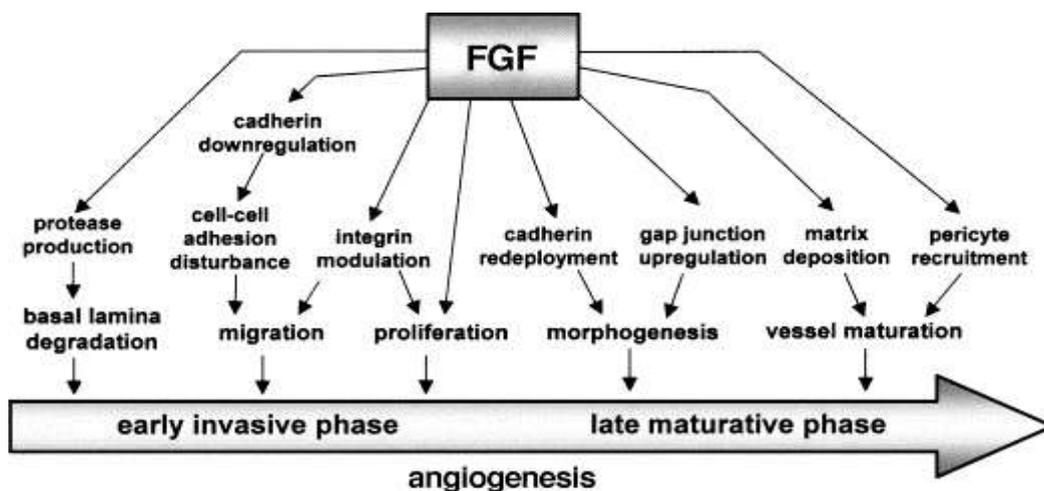
Les cellules cancéreuses doivent donc, pour proliférer, échapper à ses signaux qui interviennent notamment en maintenant la phase G1. A l'échelle moléculaire, les signaux antiprolifératifs passent principalement par la protéine du rétinoblastome (pRb) et ses deux homologues, p107 et p130 (Weinberg, 1995). Dans des conditions normales, l'hypophosphorylation de pRb contrôlée par le facteur TGF- $\beta$  permet le maintien en phase G1. Or, dans les cellules tumorales, le récepteur au TGF- $\beta$  est souvent muté ne médiant ainsi pas le signal d'hypophosphorylation pour pRb et conduisant au contraire à l'avancement du cycle vers la phase S (Biswas et al., 2008). La protéine pRb peut également, dans les cellules cancéreuses, être absente suite à des mutations de son gène ou séquestrée par des oncoprotéines virales comme la protéine E7 du papillomavirus humain (Barrow-Laing et al., 2010).

#### *d) Capacité d'angiogenèse*

L'oxygène et les nutriments apportés par le réseau vasculaire sont cruciaux pour le fonctionnement et la survie des cellules, obligeant ainsi chaque cellule à se situer à moins de 100  $\mu\text{m}$  d'un capillaire sanguin. L'angiogenèse, ou croissance pathologique de nouveaux vaisseaux pour supporter la croissance tumorale, est un processus transitoire et hautement régulé par une balance de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Pour les cellules tumorales, ce processus est critique car en l'absence d'un système vasculaire adéquat, celles-ci vont entrer en apoptose ou en nécrose. De plus, l'acquisition par les cellules tumorales de la capacité angiogénique, ou « angiogenic switch », est un événement clé dans la transition vers une tumeur cliniquement agressive. Le rôle de l'angiogenèse dans le développement des micro-métastases dormantes est par ailleurs établi (Moserle et al., 2009).

L'angiogenèse est contrôlée par des facteurs solubles et leurs récepteurs situés sur les cellules endothéliales, des intégrines, des molécules d'adhésion de la matrice extracellulaire et des molécules d'interaction cellulaire. De nombreux facteurs pro-angiogéniques ont été identifiés incluant les membres de la famille du VEGF (vascular endothelial growth factor), les angiopoïétines, les TGF- $\alpha$  et - $\beta$  (transforming growth factor), les PDGFs, le TNF- $\alpha$  (tumor

necrosis factor- $\alpha$ ), certaines interleukines, certaines chimiokines et les membres de la famille du FGF (fibroblast growth factor) (Presta et al., 2005). Ces derniers sont des facteurs pléiotropiques exerçant leur pouvoir pro-angiogénique sur de nombreux types cellulaires suite à leur fixation sur des récepteurs à tyrosine kinase. Leur action sur les cellules endothéliales est complexe et la cascade de processus conduisant à l'angiogénèse inclut la modulation de la prolifération des cellules endothéliales, leur migration, la production de protéases contrôlant la biodisponibilité cellulaire des facteurs angiogéniques et angiostatiques, l'expression de récepteurs aux cadhérines et aux intégrines et une modulation de la communication intercellulaire par les jonctions gap (Javerzat et al., 2002) (**figure 7**). Des études ont également mis en évidence l'interaction importante entre les membres des familles VEGF et FGF au cours de la lymphangiogénèse, processus critique pour la dispersion des métastases (Chang et al., 2002).



**Figure 7:** Représentation schématique des mécanismes induits par les membres de la famille du FGF dans les cellules endothéliales contribuant à l'angiogénèse *in vivo*. (Presta et al., 2005).

La trombospondine-1 (TSP-1) limite la progression tumorale en inhibant l'angiogénèse via, d'une part, des effets directs sur la migration et la survie des cellules endothéliales et d'autre part, via la modulation de la biodisponibilité des VEGF. Pendant le stade précoce de développement tumoral, les tissus sains environnants pourraient sécréter les molécules inhibitrices TSP-1 et TSP-2 contribuant ainsi au maintien de la tumeur en dormance (Kazerounian et al., 2008). Dans les cellules tumorales, l'altération de gènes suppresseurs de tumeur comme p53 ou d'oncogènes comme Myc inhiberait de plus l'expression de TSP-1.

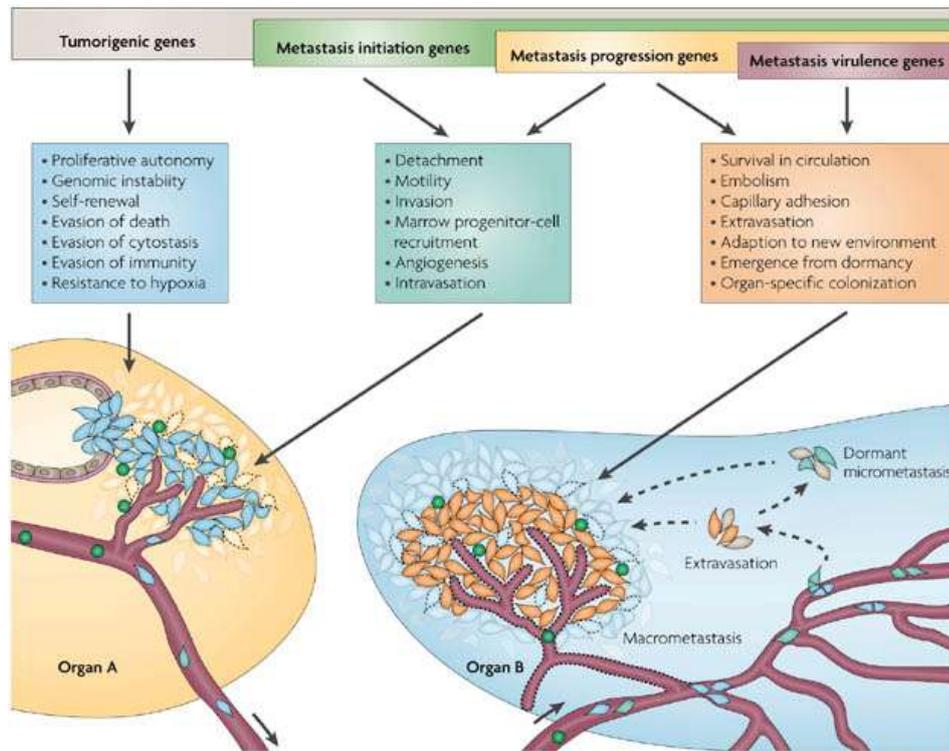
L'environnement tumoral joue aussi un rôle dans le processus d'angiogenèse. L'émission par les fibroblastes associés au cancer (CAF) de facteurs pro-angiogéniques est notamment bien documentée. Il apparaît même que tous les facteurs inducteurs de l'angiogenèse, hormis le VEGF-A, sont produits en plus grandes quantités par les cellules stromales que par les cellules tumorales (Pietras and Ostman, 2010).

La thérapie anti-angiogénique pour la lutte contre le cancer est en plein essor. Le bevacizumab, un anticorps anti-VEGF humain, a par exemple reçu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) américaine pour son utilisation clinique en complément d'une chimiothérapie en 2004 dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Ce produit est considéré comme étant le premier inhibiteur spécifique de l'angiogenèse utilisé en cancérologie et son succès est un encouragement considérable pour le développement et la mise sur le marché de nouveaux produits anti-angiogéniques (Cao, 2010).

#### *e) Capacité invasive*

Les métastases résultent de la dispersion de cellules tumorales de leur site d'origine vers un autre organe qui dépend du type et de la localisation du foyer tumoral primaire et de la voie de dissémination des métastases. La capacité des cellules tumorales à envahir et coloniser de nouveaux sites est la principale caractéristique distinctive entre les tumeurs bénignes et malignes. Les métastases sont responsables de 90% des décès par cancer. Leur survenue inclut une série d'étapes durant lesquelles les cellules cancéreuses quittent la tumeur originelle, entrent dans la lymphe et la circulation sanguine, survivent, migrent et colonisent de nouveaux organes.

En fonction de leur niveau de participation au processus métastatique, Nguyen et Massagué ont distingué trois grandes classes de gènes métastatiques : les gènes intervenant dans l'initiation des métastases, ceux intervenant dans la progression des métastases et enfin ceux responsables de la virulence des métastases (**figure 8**) (Nguyen and Massague, 2007). Les gènes du premier groupe fournissent un avantage aux tumeurs primaires en conférant la capacité aux cellules tumorales de rentrer dans la circulation sanguine. Les gènes impliqués dans la progression des métastases sont responsables d'une limitation de la croissance de la tumeur primaire et favorisent la colonisation. Enfin, les gènes de virulence métastatique permettent un avantage sélectif au niveau des sites tumoraux secondaires.



**Figure 8: Vue générale des différents évènements biologiques impliqués dans la formation des métastases.** (Nguyen and Massague, 2007).

Ces gènes subissent des modifications génétiques dans le contexte tumoral conduisant à l'altération fonctionnelle de classes de protéines notamment impliquées dans les phénomènes d'adhésion comme les immunoglobulines, les cadhérines et les intégrines. Ces altérations génétiques dans leur ensemble participent conjointement ou successivement au processus métastatique. Par exemple, la fonction de la molécule E-cadhérine, responsable du couplage des cellules par la formation de ponts, est inhibée dans la majorité des cancers épithéliaux suite à des mutations de son gène, à sa répression transcriptionnelle ou à une protéolyse de son domaine extracellulaire. Son altération constitue un évènement marquant dans l'évolution métastatique des cancers épithéliaux.

Une fois le processus métastatique démarré, le cancer devient plus difficile à contrôler. Le nombre et la localisation des métastases sont des paramètres fondamentaux pour choisir l'approche thérapeutique la plus appropriée. La plupart des traitements des cancers métastatiques vont combiner une thérapie locale, pour éliminer et neutraliser la progression des métastases, et une thérapie systémique pour détruire les micro-métastases déjà en place et prévenir les nouvelles formations. Les nouvelles approches développées actuellement visent à

neutraliser des facteurs spécifiquement impliqués dans le processus invasif tels que les intégrines ou les métallo-protéases qui transmettent notamment des signaux de croissance amplifiant le phénomène métastatique (Bergers and Coussens, 2000).

#### *f) Acquisition de résistance à l'apoptose*

L'apoptose, ou mort programmée des cellules, correspond à un type de mort cellulaire survenant soit physiologiquement, soit en réponse à des stimuli externes. Ce processus permet de compenser la division cellulaire et ainsi de maintenir l'homéostasie des tissus. L'apoptose est contrôlée par de nombreuses voies de signalisation et tout dérèglement peut conduire à un désordre de la croissance cellulaire et contribuer à la carcinogénèse.

Les travaux sur le nématode *C. Elegans* ont beaucoup contribué à l'identification de gènes humains impliqués dans l'apoptose comme les gènes de la famille Bcl2 (suppresseurs ou activateurs de l'apoptose), les caspases (protéases contrôlant la mort cellulaire) et APAF-1 (contrôlant l'activation des caspases). La machinerie apoptotique met en jeu un grand nombre de molécules pouvant être classées en deux grandes catégories :

- les molécules cibles, notamment des récepteurs de surface sur lesquels vont se lier les facteurs de survie ou de mort cellulaire ;
- les molécules effectrices qui vont induire la mort cellulaire. Ce sont principalement des couples ligand/récepteur dont les plus étudiés sont ceux impliquant Fas, le TNF- $\alpha$  et TRAIL. Les caspases jouent également un rôle clé dans l'apoptose et sont responsables de la plupart des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose.

L'induction spécifique de l'apoptose des cellules tumorales constitue actuellement une des stratégies les plus étudiées pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005).

#### **4. Traitements conventionnels du cancer**

Traiter un cancer consiste à éliminer la tumeur et à supprimer l'ensemble des cellules cancéreuses. Les traitements ont pour but de guérir le patient, de réduire le risque de récurrence,

d'augmenter la durée de vie et d'améliorer la qualité de vie. Il existe différents types de traitements (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) qui peuvent être utilisés seuls ou associés entre eux.

#### *a) La chirurgie*

La chirurgie est la méthode la plus ancienne utilisée pour traiter le cancer avec une première utilisation remontant à l'Égypte ancienne. Depuis, les techniques chirurgicales ont beaucoup évolué et la chirurgie est aujourd'hui utilisée comme un outil efficace dans la lutte contre le cancer. Rarement utilisée seule, elle fait partie de l'arsenal médical dans le management moderne du cancer.

La chirurgie intervient à plusieurs niveaux dans la lutte contre le cancer. Elle est utilisée dans la détection et la prévention de la pathologie. En effet, elle peut être utilisée dans des opérations bénignes pour retirer des structures qui, si elles ne sont pas traitées, peuvent évoluer en des structures malignes (ulcères chroniques de la peau, évolution maligne de cicatrices consécutives à des brûlures par exemple). La chirurgie peut avoir un rôle diagnostique en permettant via les biopsies de déterminer la malignité éventuelle de la tumeur et le stade de la pathologie. Un peu plus tardivement dans la progression de la maladie, la chirurgie permet également de retirer des lésions précancéreuses bien définies dans le cas de carcinome médullaire de la thyroïde par exemple (Ogilvie and Kebebew, 2006). Cette technique est également utilisée pour retirer des organes sains qui présentent de trop grands risques de devenir cancéreux (Bertagnolli, 2005; Narod and Offit, 2005).

Enfin, évidemment, la chirurgie a un rôle dans le traitement direct de la pathologie. Une évaluation pré-opératoire approfondie du patient, la détermination des risques et des bénéfices éventuels de l'intervention, ainsi que l'identification des facteurs de co-morbidité doivent être faites préalablement par le chirurgien. Le choix de l'intervention chirurgicale dépend fortement de la nature et du stade de la pathologie. Dans le cadre du traitement, la chirurgie vise l'exérèse complète de la tumeur ainsi que des ganglions et des vaisseaux lymphatiques satellites. L'acte chirurgical peut correspondre au premier traitement ou intervenir successivement à des traitements visant à réduire l'étendue de la zone cancéreuse à retirer. La chirurgie peut également permettre d'obtenir un accès vasculaire pour un traitement par chimiothérapie (Tilney et al., 1986) ou de réduire la zone cancéreuse visible en annexe d'un traitement additionnel (Al-Shammaa et al., 2008).

Les nouvelles techniques comme la radiofréquence, la chirurgie robotisée ou les interventions guidées par imagerie comme la coelioscopie visent à minimiser l'acte invasif, à diminuer la durée de l'hospitalisation et à limiter les complications post-opératoires. Néanmoins, l'approche actuelle du traitement du cancer est multidisciplinaire et son optimisation dépend d'une orchestration judicieuse des différentes possibilités thérapeutiques comme la chimiothérapie et la radiothérapie.

### *b) La chimiothérapie*

La chimiothérapie est un traitement systémique visant à éliminer les cellules cancéreuses quelque soit leur localisation dans l'organisme. Ce traitement est basé sur l'utilisation de produits chimiques aux propriétés anti-cancéreuses qui appartiennent à de nombreuses familles comme:

- les anti-métabolites qui se substituent à des acides aminés ou à des nucléotides, empêchant ainsi les synthèses nucléotidiques et chromosomiques rendant impossible la mitose. On peut citer le fluorouracile, basé sur le 5-fluoro-uracile, qui se substitue à l'uracile ;
- les agents alkylants qui agissent directement sur l'ADN en incorporant un radical méthyl comme le cyclophosphamide ou l'ifosfamide ;
- les antibiotiques comme les anthracyclines ou les anthracènediones ;
- les vinca-alcaloïdes qui sont des antimitotiques empêchant la formation du fuseau chromatique précédent la mitose comme le vincristine ou le vinblastine ;
- les dérivés du platine qui ont une activité alkylante comme le cisplatine ou le carboplatine ;
- les taxanes qui empêchent la dépolymérisation de la tubuline et ainsi la mitose comme le paclitaxel ou le docetaxel.

Entre 20 et 30 de ces drogues sont aujourd'hui couramment utilisées en thérapie anticancéreuse. Elles sont souvent associées dans des protocoles de polychimiothérapies qui visent à combiner des produits de familles différentes pour contourner les résistances intrinsèques ou acquises par les cellules cancéreuses et à associer des drogues agissant à différents stades du cycle cellulaire.

La chimiothérapie peut être utilisée dans certains cas comme seul traitement (chimiothérapie exclusive) comme par exemple pour traiter les leucémies ou les lymphomes. Elle peut être proposée avant une chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante) pour diminuer la taille de la tumeur et faciliter ainsi l'opération ou après une chirurgie (chimiothérapie

adjuvante) pour diminuer le risque de récurrence locale ou lointaine. Ce type de traitement est notamment responsable d'une augmentation de la survie chez des patients atteints de cancers colorectaux, du sein, des testicules, des ovaires et de sarcomes. En thérapie adjuvante, la chimiothérapie a augmenté le taux de guérison de 10% pour les cancers colorectaux et du sein (Quasar Collaborative et al., 2007).

### *c) La radiothérapie*

La radiothérapie s'est développée depuis que Röntgen a réussi à générer des rayons X au cours de la dernière décennie du 19<sup>ème</sup> siècle. Cette technique consiste à exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations empêchant ainsi leur multiplication en les détruisant. Il existe deux voies principales d'administration de la radiothérapie :

- la voie externe (la plus courante): les radiations sont émises en faisceau par un accélérateur linéaire de particules situé à proximité du patient ;
- la voie interne : les sources radioactives (iridium, césium, iode 131) sont implantées, sous forme de billes, de petits fils ou de grains, à l'intérieur du corps du patient. C'est la curiethérapie.

Actuellement, la radiothérapie est fréquemment utilisée puisque presque 50% des personnes développant un cancer vont y avoir recours au cours de leur traitement. Elle est particulièrement efficace dans le traitement des cancers primaires du pharynx. Elle peut également être associée aux autres traitements précédemment décrits notamment en thérapie adjuvante après une opération chirurgicale dans le cadre du cancer du sein où elle permet de réduire de 2/3 le risque de récurrence locale. Elle constitue d'autre part un traitement palliatif des métastases osseuses notamment.

## B. Le carcinome hépatocellulaire

### 1. Épidémiologie du carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), qui se développe à partir des hépatocytes, représente 80% des cancers primitifs du foie. Les autres formes de cancers du foie sont le cholangiosarcome, qui se développe au niveau de l'épithélium du canal biliaire situé à l'intérieur du foie, l'hépatoblastome, tumeur maligne du foie de l'enfant et de l'adolescent, et l'angiosarcome, qui se développe à partir des vaisseaux sanguins. Le CHC est donc la forme majoritaire de cancer primitif du foie dans le monde malgré quelques exceptions locales, comme dans l'Est de la Thaïlande où l'incidence du cholangiosarcome est élevée du fait d'une infection fréquente du canal biliaire par la douve du foie (*Opisthorchis viverrini*) à cause de la consommation de poisson cru qui conduit à une inflammation chronique, facteur de risque important pour la transformation néoplasique des cellules épithéliales du canal biliaire (Sripa et al., 2007).

Le CHC est le 5<sup>ème</sup> cancer le plus commun dans le monde chez les hommes (552 000 cas soit 7,9% du nombre total de cancer) et le 7<sup>ème</sup> le plus commun chez les femmes (226 000 cas soit 6,5% du nombre total de cancer) (Ferlay et al., 2010). Le sexe ratio moyen homme : femme est de 2,4 avec une disparité homme/femme qui s'accroît dans les zones de forte incidence (**figure 9**).

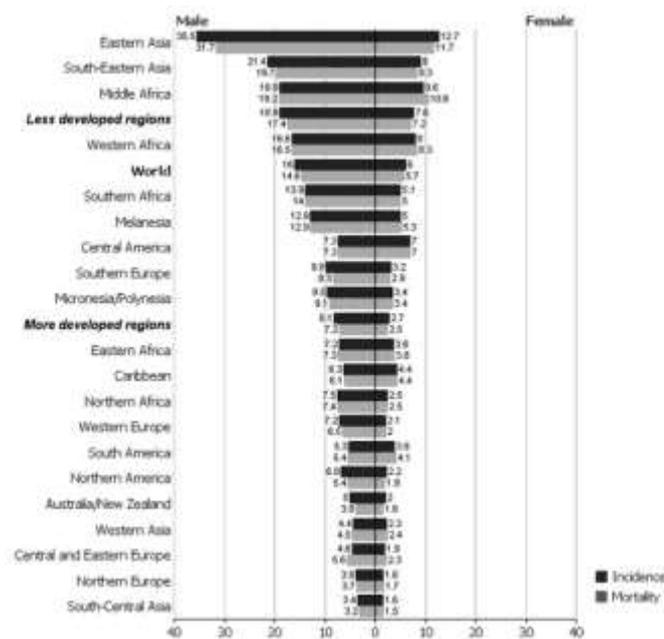
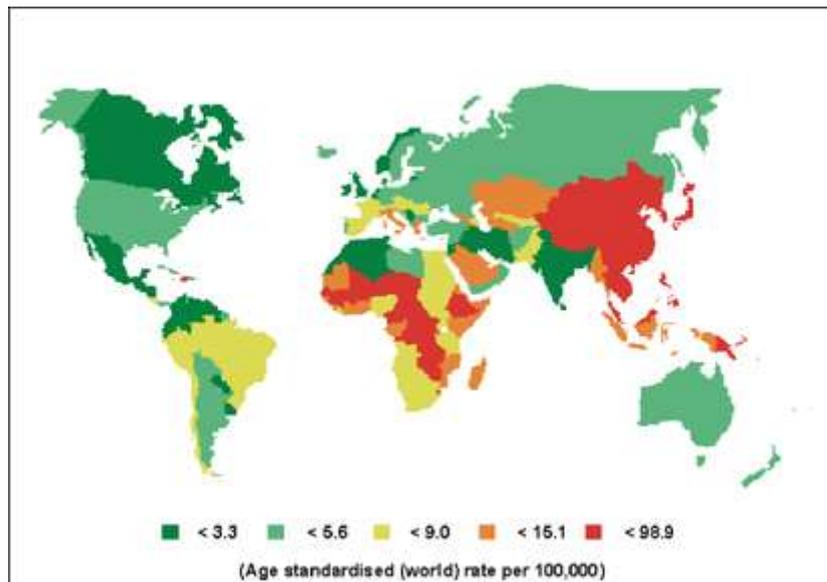


Figure 9: Incidence (pour 100 000) et mortalité du cancer du foie par classe d'âge dans le monde. (Ferlay et al., 2010).

Près de 85% des cas de CHC surviennent dans des pays en développement. Les régions du monde où l'incidence est la plus forte sont l'Est et le Sud-Est de l'Asie, l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Ouest mais aussi la Mélanésie, la Micronésie et la Polynésie. Dans les pays industrialisés, les incidences sont plus faibles, inférieures à 9 pour 100 000 chez les hommes, excepté pour le Sud de l'Europe et le Japon (**figure 10**) (Ferlay et al., 2010).



**Figure 10: Incidence du cancer du foie chez l'homme dans le monde.** (Parkin, 2004).

Cette inégalité de répartition traduit la variation de répartition des facteurs étiologiques de risques associés au CHC. En Afrique et en Asie, le CHC est majoritairement lié à une infection par le virus de l'hépatite B (VHB), associé à un régime alimentaire exposant les populations aux aflatoxines qui multiplie ce risque. Au Japon, ce cancer est de façon prédominante associé à une infection par le virus de l'hépatite C (VHC). En Europe, la cirrhose alcoolique est le facteur étiologique principal même si l'augmentation des infections par le VHC est en cause dans l'accroissement du nombre de cas dans certaines parties de l'Europe et aux USA. De plus, que ce soit dans les zones de forte ou de faible incidence, il y a une très grande disparité de l'incidence entre groupes ethniques (Flores et al., 2008).

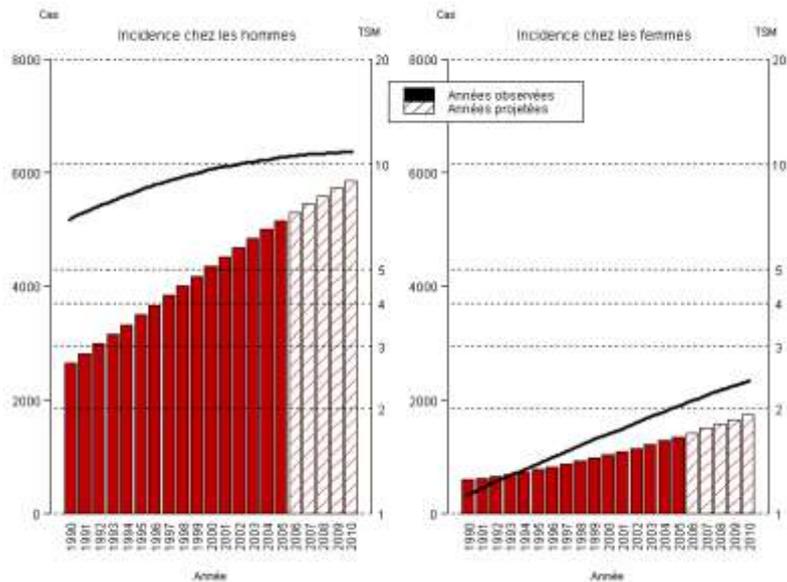
En 2008, le nombre de décès consécutifs à un cancer du foie a été estimé à 696 000 dont 478 000 hommes et 218 000 femmes. Du fait de son mauvais pronostic (ratio mortalité : incidence de 0,93), le cancer du foie est le troisième cancer le plus mortel dans le monde et la répartition géographique de ces décès est corrélée avec l'incidence du CHC (Ferlay et al., 2010). La survie après le diagnostic est souvent de moins de six mois et seulement 5 à 9% des patients atteints de CHC survivent à 5 ans ou plus (2008). L'évolution des tendances relatives

au cancer du foie sont difficiles à analyser du fait du changement de classifications des tumeurs et de l'inclusion variable des tumeurs métastatiques. Cependant, l'incidence du CHC au Japon, au Royaume Uni, en Allemagne, aux Etats-Unis et dans certains pays nordiques est en augmentation constante depuis les deux dernières décennies et ce cancer concerne progressivement une population moins âgée (Bosetti et al., 2008). Le taux de mortalité a augmenté dans certains pays dont la France. Une partie de ces augmentations peut être imputée à une meilleure détection mais les principales causes sont l'infection croissante par le virus de l'hépatite C et l'impact croissant des pathologies métaboliques non-alcooliques (2008). En France, les estimations de l'institut national de veille sanitaire (INVS) prévoient la déclaration de 5851 nouveaux cas de cancer du foie chez l'homme et 1745 chez la femme en 2010. Ces nouvelles déclarations concernent très majoritairement des personnes entre 50 à 85 ans (**tableau 5**).

Age	Incidence (Nombre de cas)	
	Homme	Femme
[0;14]	12	9
[15;49]	226	93
[50;64]	1850	349
[65;74]	1990	439
[75;84]	1469	600
[85;++]	304	255
Total	5851	1745

**Tableau 5: Nombre de cas de cancer du foie en 2010 en France par classe et par sexe.** (Source INVS : <http://www.invs.sante.fr>).

Le nombre de cas déclarés progresse chez les hommes comme chez les femmes depuis 1990, ce qui peut notamment être imputé à l'augmentation des infections virales et à un vieillissement de la population (**figure 11**).



**Figure 11: Evolution du nombre de cas (barres) de cancer du foie et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbes, échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2010 en France.** (Source INVS).

## 2. Facteurs de risque pour le CHC

Deux faits épidémiologiques caractérisent le carcinome hépatocellulaire : il survient sur une maladie du foie préexistante (cirrhose le plus souvent) et la cause de cette maladie du foie est variable en fonction de la zone géographique. Les principaux facteurs de risques associés au CHC sont donc la présence d'une cirrhose, les infections virales par le VHB et le VHC, la consommation d'alcool et la contamination par des aflatoxines.

### a) Cirrhose

La cirrhose est une affection irréversible et diffuse du foie caractérisée par une fibrose qui désorganise l'architecture lobulaire normale de l'organe. Elle induit une insuffisance hépatocellulaire liée à la diminution du nombre d'hépatocytes et à une mauvaise vascularisation, une hypertension portale en amont du foie. Elle constitue un terrain favorable pour le développement du CHC.

La cirrhose est une pathologie retrouvée chez 80 à 90% des patients de CHC et est de ce fait, le facteur de risque le plus important (Nordenstedt et al., 2010). Cette pathologie peut être induite par une infection virale par le VHB ou le VHC ou par une consommation

excessive d'alcool (cirrhose alcoolique). Il semble de plus que le stade de la cirrhose soit en lui-même un facteur de risque (Bolondi et al., 2001).

Concernant les cas de cirrhose alcoolique, il est clairement établi qu'une ingestion excessive d'alcool, entre 50 et 70 g/jour (soit 4 à 6 verres/jour) pendant des périodes prolongées, est un facteur de risque important pour le CHC. Le risque de CHC associé à des consommations d'alcool plus faibles reste incertain. De plus, il existe un effet synergique entre l'ingestion importante d'alcool et l'infection par le VHB ou le VHC. Ces facteurs agiraient en effet conjointement en favorisant activement l'apparition de la cirrhose et ainsi le développement potentiel du CHC. Une étude démontre que le risque de développer un CHC augmente de façon linéaire au-delà d'une ingestion de 60g d'alcool par jour, et que ce risque est multiplié par deux en cas d'infection par le VHC (Donato et al., 2002). Plusieurs études concluent que l'alcool en lui-même n'a pas d'effet carcinogène mais sa consommation excessive entraîne un ensemble de désordres biochimiques et génétiques qui peuvent conduire à un CHC (**figure 12**) (Stickel et al., 2002).

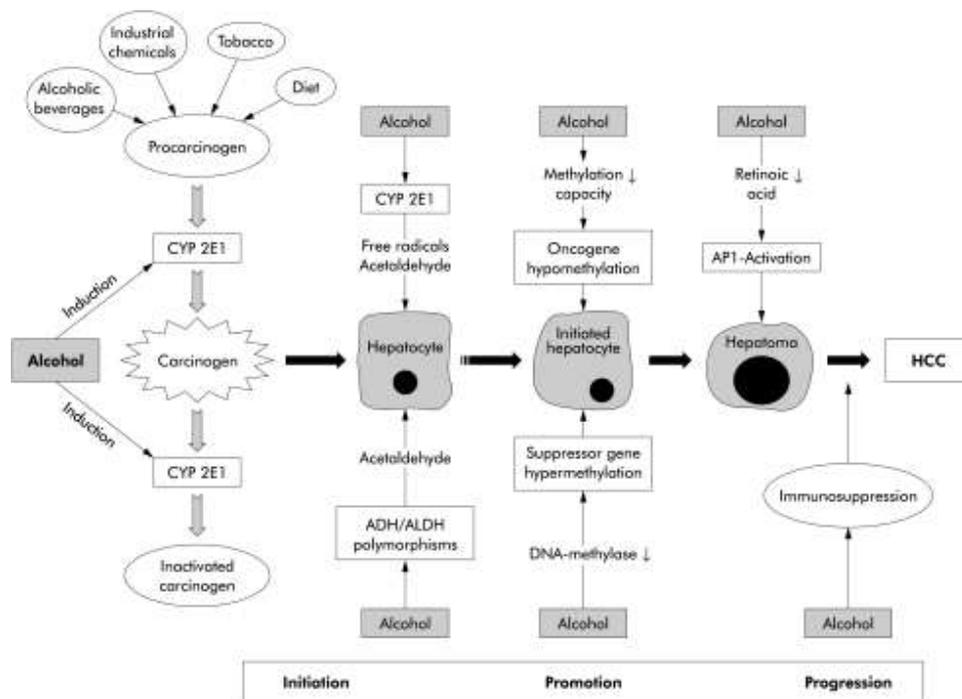


Figure 12: Effet de l'alcool sur la carcinogénèse hépatique. (Stickel et al., 2002).

La dégradation de l'alcool va libérer des métabolites acétaldéhydes toxiques, augmenter la peroxydation des lipides grâce aux radicaux libres produits et activer des procarcinogènes via l'induction du cytochrome P450. L'alcool est, de plus, responsable d'altérations de la méthylation de l'ADN conduisant à des méthylations aberrantes de gènes

suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes. Le métabolisme alcoolique peut enfin diminuer le taux d'acide rétinolique hépatique et ainsi favoriser la prolifération cellulaire et la transformation tumorale via la surexpression de la protéine activatrice AP1.

Dans les cas de cirrhoses viro-induites, les mécanismes en jeu dans le développement du CHC sont développés dans la partie B2b.

### *b) Infection virales par les virus de l'hépatite B et C*

L'infection virale par le VHB ou le VHC est, du fait de l'étroite corrélation avec la cirrhose, le facteur de risque majeur pour le CHC. En effet, après 20 à 30 ans d'infection virale chronique, entre 20 et 30% des personnes développent un foie cirrhotique (Tsai and Chung, 2010). Ainsi, jusqu'à 85% des carcinomes hépatocellulaires sont attribuables au VHB (54%) ou au VHC (31%) (2008). Les risques de développer un CHC sont 5 à 15 fois plus importants pour les malades chroniques de l'hépatite B et 11.5 à 17 fois plus importants pour les malades chroniques de l'hépatite C (Donato et al., 1998; Donato et al., 2002; El-Serag and Rudolph, 2007). Bien que ces deux virus soient hépatotropes, il existe d'importantes différences entre les mécanismes oncogéniques du VHB et du VHC.

#### *(1) Le virus de l'hépatite B (VHB)*

Le virus de l'hépatite B appartient à la famille des Hepadnavirus. Le virion est constitué d'une nucléocapside enveloppée par une bicouche lipidique sur laquelle on retrouve les antigènes de surface du virus (HBsAg). La nucléocapside renferme l'ADN viral partiellement double brin avec quatre cadres de lecture pour l'enveloppe, la nucléocapside, la polymérase et la protéine X. Le virus est hautement contagieux et est transmis par contact de la peau ou des muqueuses avec du sang ou des fluides corporels contaminés. Dans les régions endémiques, le virus est souvent transmis verticalement de la mère à l'enfant et plus de 90% des personnes développent une infection chronique. Dans les régions non-endémiques, la transmission est horizontale et l'infection a lieu à l'âge adulte lors de rapports sexuels ou lors de partage de seringue chez les personnes droguées et 90% des infections aiguës se résolvent spontanément (Nordenstedt et al., 2010).

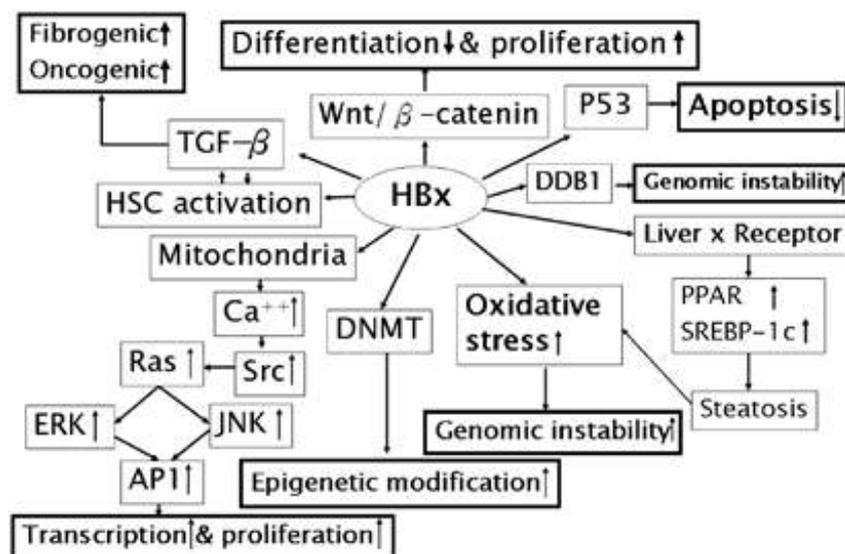
L'infection par le VHB est usuellement définie par le relargage de l'antigène de surface HBsAg dans la circulation sanguine pendant une période d'au moins six mois suivant l'infection, même si le virus peut aussi persister sous forme occulte sans libération d'HBsAg.

D'après l'organisation mondiale de la santé, environ 400 millions de personnes sont infectées de façon chronique par le VHB dans le monde. Sur l'ensemble de ces personnes porteuses, au moins 50% vont rester asymptomatiques tandis que les autres vont développer des maladies chroniques du foie de sévérité variable, l'atteinte la plus sérieuse étant le développement d'une cirrhose puis d'un CHC (2008). Environ 50% des cas de CHC sont imputables à l'infection chronique par le VHB (Parkin, 2006). Cependant, de très importantes disparités régionales sont à noter. En Corée du Sud, environ 70% des cas de CHC sont attribuables au VHB alors que cela ne concerne que 15% des cas de CHC déclarés au Japon (Kim et al., 2008). 3% des porteurs de CHC en Suède sont positifs pour HBsAg, 9% aux USA, 19% en Italie et jusqu'à 55% des malades en Grèce (Raza et al., 2007). D'autre part, malgré le fait que dans 70 à 90% des cas, les CHC associés au VHB se développent sur un foie déjà cirrhotique (El-Serag and Rudolph, 2007), le développement de CHC sur des foies non-cirrhotiques, notamment dans des régions où l'infection par le VHB est endémique, souligne l'existence d'une action directe du facteur étiologique VHB (Ishikawa, 2010).

Les mécanismes moléculaires conduisant à la tumorigenèse induite par le VHB font l'objet de controverses mais en l'absence d'un oncogène dominant codé par le génome viral, des rôles indirects ont été proposés. Ils incluent notamment l'activation de gènes associés au cancer suite à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte, l'induction d'une instabilité génétique suite à l'intégration virale ou à la régulation par la protéine X virale et les effets à long terme des protéines virales dans le déclenchement d'une pathologie immunitaire du foie (Neuveut et al., 2010). Des séquences intégrées du génome sont retrouvées dans près de 80% des CHC associés au VHB (Bonilla Guerrero and Roberts, 2005). Certains gènes du virus sont plus retrouvés que d'autres dans les tissus tumoraux comme le gène tronqué pré-S2/S, le gène codant la protéine X et le gène codant la protéine épissée HBSP (Chemin and Zoulim, 2009). L'intégration virale peut donc concourir à la tumorigenèse soit en modulant l'activité de gènes de l'hôte, soit via l'expression des protéines virales dont les gènes sont intégrés. Ainsi, l'intégration du VHB induit de nombreuses altérations génétiques dans le génome de l'hôte incluant des délétions chromosomiques, des translocations, la production de transcrits fusionnés, l'amplification de certains gènes et une instabilité génomique générale (Bonilla Guerrero and Roberts, 2005). Alors que pendant longtemps, l'intégration du VHB a

été considérée comme aléatoire, des travaux récents montrent que les sites d'intégration concernent souvent des familles de gènes impliqués dans la survie cellulaire (TNF receptor-associated protein 1), la prolifération (MAPK1, cycline A) et l'immortalisation (hTERT) (Murakami et al., 2005; Tamori et al., 2005). Les zones d'intégration peuvent ainsi jouer un rôle important dans les voies de signalisation conduisant au carcinome hépatocellulaire.

Comme évoqué précédemment, l'intégration de séquences virales et donc l'expression à long terme de protéines virales, comme la protéine de surface et la protéine X, peuvent aussi avoir un rôle dans la carcinogénèse hépatique. Ainsi, l'accumulation des protéines de surface du VHB dans le réticulum endoplasmique (RE) perturberait la machinerie du RE et le mécanisme de repliement des protéines aboutissant à un stress oxydatif et à la libération de radicaux libres (ROS) (He, 2006). Or le stress oxydatif causé par les ROS peut avoir de nombreuses conséquences oncogéniques comme des dommages sur l'ADN ou la dérégulation de voies de signalisation contrôlant la prolifération, la survie et la mort cellulaire. De plus, la protéine X a été désignée par certains auteurs comme une oncoprotéine virale. Malgré certaines controverses, elle serait impliquée dans la transformation des cellules hépatiques de par ses effets pléiotropiques sur la régulation du cycle cellulaire, les voies de signalisation et l'ADN de l'hôte (**figure 13**) (Neuveut et al., 2010).



**Figure 13:** Voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse induite par la protéine X du VHB. (Tsai and Chung, 2010).

Depuis le début des années 80, des vaccins efficaces et accessibles contre le VHB sont disponibles. Leur utilisation massive a permis de réduire de façon significative le nombre de

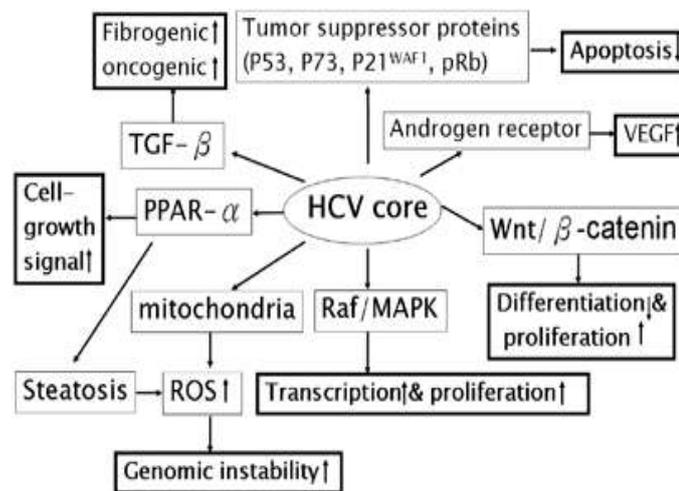
personnes infectées. A Taiwan, où l'infection par le VHB touche principalement les adolescents et où le CHC se déclare chez les jeunes adultes, une chute significative de l'incidence du CHC a été observée chez les jeunes adultes dans les années suivant l'introduction de la vaccination de masse (Huang and Lin, 2000).

## (2) Le virus de l'hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des Flavivirus. C'est un virus à ARN monocaténaire qui possède un unique cadre de lecture permettant la synthèse d'une polyprotéine codant pour les protéines structurales (protéine de la capsid, protéines d'enveloppe E1 et E2) et non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). 3% de la population mondiale sont infectés de façon chronique par le VHC, soit environ 180 millions de personnes. Le virus aurait commencé à infecter des personnes jeunes au Japon dans les années 1920, dans le Sud de l'Europe dans les années 1940, puis en Amérique du Nord dans les années 1960 et 1970 (Armstrong et al., 2000). La transmission du VHC se fait par voie sanguine, principalement lors des transfusions, par partage des seringues entre toxicomanes et utilisation de matériel médical mal désinfecté. Le virus a circulé dans les banques nationales de sang jusqu'en 1990 et la mise au point d'un test de recherche du VHC. Depuis cette date, le nombre de nouvelles infections a considérablement diminué. Actuellement, la prévalence de l'infection au virus de l'hépatite C est estimée par l'organisation mondiale de la santé à 2% (soit 1/3 de la prévalence du VHB) (Shepard et al., 2005). Elle varie cependant entre 0,1 et 10% selon les pays, les zones les plus touchées étant l'Afrique et l'Asie.

La relation entre l'infection par le VHC et le risque accru de CHC est bien établie. Les marqueurs de l'infection au VHC sont retrouvés dans une proportion variable de cas de CHC : c'est le cas dans 44 à 66% des cas en Italie et dans 80 à 90% des cas au Japon (Nordenstedt et al., 2010). Le taux de patients VHC positifs développant un CHC après 30 ans d'infection virale varie entre 1 et 3% (Hassan et al., 2002). D'une part, le virus augmente le risque de CHC en favorisant la fibrose et la cirrhose. En effet, le taux de patients présentant une cirrhose après 30 ans d'infection au VHC varie entre 15 et 35% (Freeman et al., 2001). D'autre part, le virus en lui-même peut favoriser le développement du CHC. Le VHC ne peut pas rétro-transcrire son génome et est donc de ce fait, incapable de s'intégrer dans le génome

de son hôte. A la place, les protéines virales et les réponses immunitaires qu'elles induisent contribuent majoritairement au processus oncogénique du VHC. La protéine de capsid du VHC semble notamment impliquée dans l'inhibition de l'apoptose, la transduction des signaux de croissance cellulaire, la formation des ROS, le métabolisme des lipides favorisant la stéatose et l'activation de la transcription, de la différenciation et de la prolifération (**figure 14**) (Anzola, 2004; Irshad et al., 2006). De par ces effets pléiotropiques, elle serait ainsi en jeu dans de nombreux mécanismes concourant à la tumorigenèse.



**Figure 14:** Voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse induites par la protéine de capsid du VHC. (Tsai and Chung, 2010).

Les protéines non-structurales NS3 et NS5 sont également impliquées dans le développement du CHC. NS3 et NS5A inhiberaient notamment le suppresseur de tumeur p53 (Deng et al., 2006; Lan et al., 2002). NS5A est aussi impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires comme l'apoptose, la transduction des signaux, la transcription et la production de ROS. Elle activerait par exemple la voie PI3K-AKT et inactiverait ainsi le facteur pro-apoptotique BAD (He et al., 2002).

### c) Infection par les aflatoxines

Dans les pays de faibles ressources, l'ingestion d'aflatoxines, mycotoxines produites par les moisissures du genre *Aspergillus flavus* et *parasiticum*, est un facteur de risque important pour le CHC. Les aflatoxines seraient de plus responsables d'une inhibition de la croissance et de la suppression de l'immunité (Gong et al., 2004; Turner et al., 2003). Elles

contaminent de nombreuses cultures traditionnelles comme l'arachide, le coton ou le maïs. La contamination est particulièrement importante pour les céréales stockées du fait de la chaleur excessive, de l'humidité et des dégâts des rongeurs qui favorisent la prolifération et la diffusion des spores (Turner et al., 2005). Ainsi, l'aflatoxine B1, produite par *Aspergillus flavus*, est un contaminant majeur des cultures en Afrique Sub-saharienne, en Asie du Sud Est et dans certaines régions d'Amérique latine. La dépendance entre l'agriculture de subsistance, la diversité alimentaire réduite et la contamination par les toxines conduit dans ces régions à de forts niveaux d'exposition aux aflatoxines au cours de la vie. La métabolisation de la toxine dans le foie produit des époxydes qui vont se lier de façon covalente sur des guanines. Cela induit, par exemple, la transversion spécifique d'une arginine en une sérine sur la troisième base du codon 249 du gène suppresseur de tumeur p53. Cette mutation caractéristique est retrouvée dans 30 à 60% des cas de CHC dans ces régions (Zhang et al., 2005). Chez les personnes infectées de façon chronique par le VHB et exposées aux aflatoxines, le taux de cette mutation est encore plus élevé (Kirk et al., 2005). L'inactivation de p53 limite son effet promoteur sur l'apoptose et conduit également à des altérations dans le contrôle des dommages sur l'ADN (Schmitt et al., 2002). Par conséquent, les mutations de p53 induites par les aflatoxines rendraient les hépatocytes hautement sensibles aux effets des intégrations du VHB qui activent de nombreuses voies oncogéniques et prédisposent au développement de CHC (Bonilla Guerrero and Roberts, 2005).

#### d) *Autres facteurs*

De nombreux autres facteurs peuvent être mis en cause dans le développement d'un CHC. Dans les pays industrialisés, les principaux facteurs de risques sont la consommation excessive d'alcool, l'obésité et le tabac (Marrero et al., 2005). Comme vu précédemment, l'alcool est essentiellement responsable du développement d'une cirrhose, précurseur du CHC. La relation entre la consommation de tabac et le développement d'un CHC reste très controversée avec des résultats variant de l'absence de risque supplémentaire à une augmentation du risque par 3 entre fumeurs et non-fumeurs. Cela suggère que s'il existe, le risque associé à la consommation de tabac est faible et restreint à une partie de la population. Une augmentation de l'incidence du CHC a été corrélée à l'obésité et au diabète de type 2 dans de nombreux pays (Nordenstedt et al., 2010). Il faut aussi ajouter des associations de CHC avec des cas de stéatose non-alcoolique et avec de nombreuses pathologies

métaboliques génétiques comme l'hémochromatose héréditaire, la tyrosinémie et le déficit en alpha 1-antitrypsine.

### 3. Caractéristiques du carcinome hépatocellulaire

#### a) *Données cliniques, morphologiques et histologiques*

Les symptômes communs aux cas de CHC sont des douleurs abdominales, une perte de poids, une fatigue, un gonflement abdominal et une asthénie. La plupart des patients, notamment en Afrique Sub-saharienne, présente une hépatomégalie. La présence d'ascites et la jaunisse peuvent être d'autres signes cliniques de la pathologie. Les CHC qui surviennent sur des foies cirrhotiques compromettent les fonctions hépatiques déjà dérégulées et de ce fait, la défaillance hépatique est souvent la cause du décès comme c'est souvent le cas au Japon ou aux Etats-Unis (2008). Cependant, hormis pour les patients régulièrement suivi du fait d'une cirrhose déclarée ou de facteurs de risques connus, les CHC précoces sont asymptomatiques et le manque de contrôle associé à des stratégies de dépistage mal définies font que la plupart des patients (environ 80%) présentent des stades déjà avancés de la maladie ou des foies inopérables lorsqu'ils sont pris en charge (Thomas and Abbruzzese, 2005).

Le carcinome hépatocellulaire est une tumeur épithéliale maligne des hépatocytes. Pendant le stade initial (<2cm), le CHC est en général bien différencié histologiquement avec une architecture de type trabéculaire où les cellules tumorales sont disposées en fines lames sans capsule. Elles vont se développer et former des lames d'épaisseur variable entourées par des sinusoides. Les trabécules vont alors devenir de plus en plus épaisse et les cellules vont se différencier. Le CHC a une affinité marquée pour le système veineux. Dès qu'il atteint plus de 3cm et s'il n'est pas encapsulé, il va se propager rapidement par le système veineux porte et sus-hépatique et former des nodules de perméation et des embolus tumoraux. L'invasion est étroitement liée à la taille de la tumeur puisque 50% des tumeurs de moins de 3cm s'accompagnent d'invasion contre 20% des tumeurs de moins de 2 cm. L'envahissement est un facteur de mauvais pronostic aussi bien pour la récurrence tumorale que pour la survie. En effet, les embolus sont à l'origine des nodules satellites à proximité ou à distance de la tumeur. Certains CHC sont entourés d'une capsule d'épaisseur variable formée d'une fibrose. 85% des tumeurs entre 2 et 5 cm sont encapsulées alors que seulement 45% des tumeurs de

plus de 5cm le sont. Cela est sans doute dû à la destruction de la capsule par les tumeurs volumineuses. La présence d'une capsule est associée à une meilleure survie.

### *b) Classification clinique du CHC*

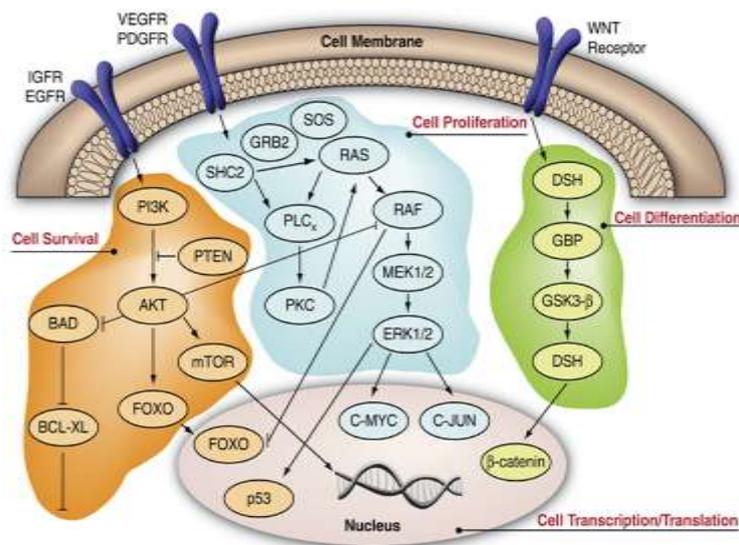
Les systèmes de classification ont pour but de regrouper des patients aux pronostics identiques et doivent permettre de sélectionner le traitement le plus approprié. En oncologie, le stade de la tumeur est le principal élément prédictif, mais la classification du CHC est particulièrement complexe. La classification d'Okuda a servi de base et a été très largement utilisée pour distinguer 4 types de CHC (Okuda et al., 1985):

- le type infiltrant : une tumeur unique aux limites imprécises, non encapsulée, très souvent propagée dans le système veineux, plus souvent associée à un foie non-cirrhotique que cirrhotique ;
- le type expansif : une ou plusieurs tumeurs nodulaires, encapsulées, repoussant le parenchyme hépatique avoisinant sans l'envahir, sans formation d'embolus veineux et souvent associé à un foie cirrhotique ;
- le type mixte : CHC de type expansif mais avec des infiltrations au-delà de la capsule, soit contiguës, soit à distance ;
- le type diffus : multiples nodules de 0,5 à 1 cm de diamètre, répartis dans le foie cirrhotique et qui ne fusionnent pas.

Cependant, cette classification ne permettant pas de faire la distinction entre les stades précoces et avancés de la maladie, elle est surtout utilisée pour identifier les stades terminaux de la pathologie. Cinq nouvelles classifications ont été établies pour permettre une distinction adéquate de l'état d'avancement de la pathologie : la classification japonaise (1994), la classification française (Chevret et al., 1999), le programme italien pour le cancer du foie (Llovet and Bruix, 2000), les stades de cancer du foie par la clinique de Barcelone (Llovet et al., 1999) et le score index de pronostic de l'université de Chine (Leung et al., 2002). Cependant, aucune de ces classifications n'ont reçu de validation globale. La classification de Barcelone est utilisée pour le choix du traitement notamment pour des tumeurs précoces, les autres classifications semblent être utiles pour pronostiquer les cas de CHC plus avancés. Un consensus sur la classification des stades de CHC reste à trouver.

### c) Mécanismes moléculaires du CHC

Il est maintenant bien démontré que deux mécanismes participent à l'hépatocarcinogénèse : d'une part, la cirrhose associée à une régénération hépatique après les dommages causés au tissu par une infection virale, des toxines (alcool, aflatoxines,...) ou des désordres métaboliques et d'autre part, les mutations d'un ou de plusieurs oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur. Ces deux mécanismes aboutissent à l'altération de nombreuses voies de signalisation cellulaires importantes. Les plus importantes voies impliquées dans le CHC sont celles médiées par VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor), HGF (hepatocyte growth factor, aussi appelé c-MET), MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/AKT/mTOR (phosphatidylinositol-3 kinase/AKT/mammalian target of rapamycin) et la voie WNT/ $\beta$ -catenin (**figure 15**).

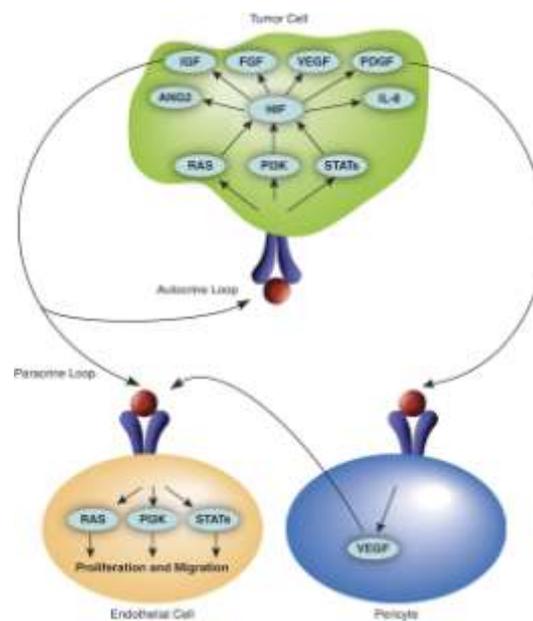


**Figure 15: Principales voies de signalisation en jeu dans le développement du carcinome hépatocellulaire.** (Whittaker et al., 2010).

L'ensemble de ces voies de signalisation contrôle des fonctions critiques de la vie cellulaire comme la survie, la prolifération, la différenciation et la transcription/traduction. L'altération de ces voies va donc avoir des conséquences évidentes pour le développement du carcinome hépatocellulaire.

## (1) Implications pour l'angiogenèse du CHC

Le foie est un organe fortement vascularisé et dont la régénération est dépendante d'une angiogenèse efficace. La croissance tumorale, l'invasion des cellules tumorales et le développement des métastases sont également hautement dépendants de l'angiogenèse (Semela and Dufour, 2004). Dans le CHC, l'angiogenèse est contrôlée par des interactions autocrines et paracrines entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales vasculaires et les péricytes (**figure 16**). Au cours du processus angiogénique, la désorganisation de la microvasculature existante conduit à une hyperperméabilité vasculaire, à un remodelage de la matrice cellulaire et à l'activation des cellules endothéliales. Une fois activées, celles-ci prolifèrent, migrent et participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Papetti and Herman, 2002). Enfin, les péricytes, cellules contractiles, sont à leur tour activées et recrutées pour stabiliser la nouvelle vasculature.



**Figure 16: Voies de signalisation de l'angiogenèse.** (Whittaker et al., 2010).

Dans le cadre du CHC, la balance de facteurs pro et anti-angiogéniques est fortement altérée et l'ensemble des cellules tumorales, des cellules endothéliales et des péricytes vont sécréter un net excédent de facteurs pro-angiogéniques favorisant l'activation et le recrutement des cellules endothéliales et des péricytes. De nombreux facteurs angiogéniques sont surexprimés dans les tumeurs hépatiques comme le VEGF-A, l'angiopoïétine-2 et le PDGF (Mas et al., 2007). Une surexpression du VEGF et des récepteurs aux VEGF est de plus retrouvée dans des biopsies de CHC et dans les sérums de certains patients (Poon et al.,

2004; Shimamura et al., 2000). La protéine X de l'hépatite B a également été associée à une surexpression du récepteur de type 3 aux VEGF (VEGFR-3) (Lian et al., 2007). VEGF joue un rôle clé dans la régulation du CHC : des taux élevés de VEGF ont été corrélés avec le stade tumoral du CHC, un mauvais pronostic après une résection, la récurrence de la pathologie, un mauvais pronostic de survie, une invasion vasculaire et un risque d'embolie de la veine porte (Whittaker et al., 2010).

## (2) Voies induites par EGFR, IGF et HGF

Alors que le rôle des récepteurs aux VEGF est clairement établi dans le CHC, celui des récepteurs aux EGF (EGFR) fait toujours l'objet de controverse. Malgré la fréquence importante d'expression des EGFR dans les CHC (60 à 80%), leur mutation n'est pas détectée ou considérée comme rare (<1%). Cependant, une forte expression de TGF- $\alpha$ , ligand des EGFR, dans les CHC pré-néoplasiques pourrait suggérer un rôle des récepteurs dans les CHC précoces (Whittaker et al., 2010).

La signalisation par les facteurs de croissance insulino-mimétiques (IGFs) est contrôlée par la fixation des ligands (IGF-1 et IGF-2) sur le récepteur membranaire IGF-1R. Ce récepteur régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la motilité et l'inhibition de l'apoptose. La fixation du ligand conduit à une autophosphorylation rapide du récepteur suivie de la phosphorylation de ces cibles intracellulaires. Celles-ci vont alors initier des effecteurs cellulaires qui vont activer PI3K, AKT et la voie RAF/MEK/ERK (Pollak et al., 2004). Dans le CHC, cette voie est souvent dérégulée. IGF-2 est en effet surexprimé dans 16 à 40% des CHC humains tandis que son récepteur IGF-2R est sous-exprimé dans 80% des CHC (Cariani et al., 1988; De Souza et al., 1995). Dans les modèles animaux de CHC, une surexpression d'IGF-2 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire tandis que l'inhibition de sa production dans des lignées hépatocytaires limite la prolifération et favorise l'apoptose (Lund et al., 2004; Schirmacher et al., 1992).

Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) est une cytokine multifonctionnelle qui se lie au récepteur à tyrosine kinase c-MET principalement retrouvé sur la membrane des cellules épithéliales et endothéliales. Cette liaison va conduire à l'activation, via des protéines adaptatrices, de la voie RAF/MEK/ERK (Schlessinger, 2000). Une surexpression de c-MET est retrouvée dans 20 à 48% des CHC et a été associée à une diminution de 5 ans de la survie des patients (Ueki et al., 1997). De plus, cette surexpression participe à la classification des

CHC humains, cette signature moléculaire définissant des patients au mauvais pronostic et avec un phénotype de CHC agressif (Kaposi-Novak et al., 2006).

### (3) Voie RAF/MEK/ERK

Cette voie, aussi nommée ERK/MAPK, est une voie de transduction de signal ubiquitaire régulant des processus cellulaires cruciaux comme la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et la survie (Gollob et al., 2006). La surexpression ou l'activation de molécules impliquées dans cette voie contribuent à la tumorigenèse, à la progression tumorale et à l'évolution métastatique de nombreuses tumeurs solides (Leicht et al., 2007). Dans cette voie, la GTPase RAS et la sérine thréonine kinase RAF sont les régulateurs moléculaires clés. Les étapes intermédiaires sont régulées par les protéines kinases mitogènes extracellulaires MEK1 et MEK2 responsables de la phosphorylation et de l'activation des protéines kinases ERK1 et ERK2. Ces dernières régulent l'activité cellulaire en agissant sur plus de 100 substrats cytoplasmiques ou nucléaires incluant des inducteurs directs d'expression de gènes, des facteurs de transcription et des kinases impliquées dans le cycle cellulaire (Whittaker et al., 2010). De plus, la protéine RAS intervient également dans d'autres voies cellulaires comme la voie PI3K/AKT/mTOR ou la voie phospholipase C/protéine kinase C.

Dans le CHC, la voie RAF/MEK/ERK est constitutivement activée, ce qui suggère un rôle de cette voie dans la tumorigenèse. L'isoforme C de RAF (CRAF) pourrait jouer un rôle important dans le CHC puisqu'elle est retrouvée dans 100% des échantillons testés dans une étude de 2004 (Hwang et al., 2004). De plus, la phosphorylation des kinases MEK1 et MEK2 est 7 fois plus élevée dans la tumeur que dans le tissu sain environnant (Huynh et al., 2003). L'activation de ERK1/2 semble être associée à une tumeur agressive (Schmitz et al., 2008).

L'activation de cette voie de signalisation dans les tumeurs solides survient soit suite à des mutations oncogéniques sur le gène RAS, soit suite à l'activation constitutive de l'isoforme C de RAF consécutivement à une surexpression dérégulée des facteurs de croissance et de leurs récepteurs associés (Gollob et al., 2006). Dans le cas du CHC, le taux de mutation de RAS est controversé (entre 4 et 30% des CHC). Par contre, l'activation de la voie RAF/MEK/ERK est induite par l'infection par le VHB. En effet, l'intégration du génome viral va conduire à l'expression de deux activateurs transcriptionnels, HBX et pré-S2, qui vont cibler l'activation de la voie (Stockl et al., 2003).

## (4) Voie PI3K/AKT/mTOR

L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR est un déterminant majeur de la croissance tumorale et de la survie cellulaire pour de nombreuses tumeurs solides (Chen et al., 2005b). La fixation des facteurs de croissance, notamment IGF et EGF, sur leurs récepteurs active PI3K qui va, via l'intermédiaire d'un second messenger lipidique, activer la sérine thréonine kinase AKT. En plus de réguler de nombreux facteurs de transcription, AKT va phosphoryler de nombreuses protéines cytoplasmiques et notamment mTOR et le promoteur de mort associé à Bcl2, BAD (Avila et al., 2006). L'activation de mTOR favorise la prolifération cellulaire et l'inactivation de BAD limite l'apoptose et augmente la survie cellulaire. Dans les tissus sains, cette voie est inhibée par la phosphatase PTEN qui cible le second messenger lipidique de PI3K (Roberts and Gores, 2005).

La voie PI3K/AKT/mTOR peut être suractivée suite à une forte stimulation des récepteurs tyrosine kinase, en particulier du récepteur à l'IGF et à l'EGF. Or ces deux récepteurs sont surexprimés dans les CHC et les foies cirrhotiques (Alexia et al., 2004). De la même manière, l'EGF et les facteurs de croissance associés sont souvent surexprimés dans les CHC. D'autre part, le gène PTEN est muté dans 5% des CHC, est fréquemment délété et son expression est réduite dans presque 50% des cas de CHC conduisant à une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Hu et al., 2003). De plus, l'expression de PTEN peut être directement limitée par la protéine HBX du VHB (Feitelson et al., 2004). Enfin, la phosphorylation d'AKT est impliquée dans la récurrence des CHC précoces et est associée à un mauvais pronostic (Nakanishi et al., 2005). Des mutations du gène PI3KCA qui code pour la sous-unité catalytique de PI3K ont été détectées dans 35% des échantillons de CHC testés, or ces mutations pourraient activer la voie PI3K/AKT/mTOR (Lee et al., 2005). Enfin, mTOR, dont le blocage *in vivo* dans des modèles de xénogreffe de CHC limite la progression tumorale et augmente la survie, pourrait jouer un rôle crucial dans la modulation de la voie (Villanueva et al., 2008). Des niveaux élevés de mTOR phosphorylés sont détectés dans 15% des cas de CHC et une élévation de la kinase p70 S6, substrat immédiat de mTOR phosphorylé est observée dans 45% des cas de CHC (Sahin et al., 2004).

(5) Voie WNT/ $\beta$ -caténine

Un évènement carcinogène majeur et précoce dans le développement du CHC semble être une régulation anormale du facteur de transcription  $\beta$ -caténine, participant clé dans la voie WNT. Dans des conditions normales, la fixation de ligands glycoprotéiques riches en cystéine sur les récepteurs de surface active la protéine DSH empêchant ainsi la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et par la suite, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en  $\beta$ -caténine conduit à sa translocation du cytoplasme vers le noyau. Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine agit comme un co-activateur pour stimuler la transcription de gènes et l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (comme MYC, MYB, CJUN et CYCD1), dans l'angiogenèse, dans l'inhibition de l'apoptose et la formation de la matrice extracellulaire (Avila et al., 2006).

Or la  $\beta$ -caténine est mutée dans 17% des CHC et ces mutations sont particulièrement retrouvées dans les CHC associés à une infection chronique par le VHC (Giles et al., 2003). De plus, dans 50 à 70% des cas de CHC, les cellules tumorales présentent des niveaux importants de  $\beta$ -caténine cytoplasmique et nucléaire (Wong et al., 2001). Cette accumulation constitue un avantage pour les cellules tumorales en favorisant la prolifération et en supprimant la différenciation. Cependant, la seule accumulation de  $\beta$ -caténine ne semble pas permettre la transformation d'un état non malin à un CHC (Giles et al., 2003). Récemment, il a été montré que le TFG- $\beta$  pouvait activer la voie WNT/ $\beta$ -caténine en favorisant la distribution cytoplasmique et l'aggrégation périnucléaire de la  $\beta$ -caténine (Hoshida et al., 2009). Or, TFG- $\beta$  est induit de façon persistante pendant l'hépatite et favorise la progression de la cirrhose en accélérant le dépôt de matrice extracellulaire (Matsuzaki, 2009). De plus, une surexpression soutenue de TGF- $\beta$  favoriserait la croissance néoplasique (Rossmanith and Schulte-Hermann, 2001). Cependant, des fonctions opposées ont été associées au TGF- $\beta$ , il pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur pendant les stades précoces et avoir un rôle de promoteur tumoral pendant les stades néoplasiques en induisant les caractères invasifs et métastatiques.

*d) Classification moléculaire du CHC*

Il est bien établi que le cancer est une maladie du génome et, comme pour de nombreux autres types de tumeurs solides, un grand nombre d'altérations génétiques et

épigénétiques sont accumulées au cours du processus d'hépatocarcinogénèse. Les développements récents d'outils d'analyse du génome ont permis de mettre en évidence la diversité moléculaire des CHC humains. Parmi toutes les classifications moléculaires établies, il apparaît que les déterminants majeurs pour l'identification de sous-groupes de tumeurs sont les mutations géniques concernant les oncogènes et les suppresseurs de tumeur. Chaque CHC résulte d'une combinaison spécifique d'altérations qui peuvent être quantitatives (perte ou gain de segment chromosomique), qualitatives (mutations) ou épigénétiques et dans de nombreux cas, concernent des extinctions de gènes suite à l'hyperméthylation de leurs promoteurs (Zucman-Rossi, 2010).

Certaines altérations génétiques sont communes avec de nombreuses autres pathologies cancéreuses alors que d'autres sont quasiment exclusivement retrouvées dans les tumeurs hépatocellulaires comme c'est le cas pour les mutations de IL6ST (interleukin 6 signal transducer) ou HNF1A (hepatic nuclear factor 1A). Les principales mutations observées dans les CHC et leur association clinique sont présentées dans le **tableau 6**.

Gene	Protein	Mutated HCC (%) Number of Samples (n)	Type of Mutation
CTNNB1 (3p22-21.3)	Catenin (cadherin-associated protein), $\beta$ 1 ( $\beta$ -catenin)	5-50% n > 3500	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense in exon 3 and large in-frame deletions</li> <li>• Activation of the Wnt/<math>\beta</math>-catenin signal transduction pathway</li> </ul>
AXIN1 (16p13.3)	Axis inhibition protein 1	5-25% n > 300	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsense, missense (exon 3-5) and frame-shift variants</li> <li>• Activation of the Wnt/<math>\beta</math>-catenin pathway</li> </ul>
AXIN2 (17q23-24)	Axis inhibition protein 2	3-10% n > 150	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsense and missense variants</li> <li>• Putative change in Wnt/<math>\beta</math>-catenin activity</li> </ul>
TP53 (17p13)	Tumor protein p53	10-61% n > 2600	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense (hotspot for R249S), nonsense, frame-shift and splicing variants</li> <li>• Inactivating TP53 pathway</li> </ul>
HRAS (11p15.5) KRAS (12p12.1) NRAS (1p13.2)	Ras proto-oncogene	<3-5% n > 200	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variants</li> <li>• Activation of the ras pathway</li> </ul>
HNF1A (12q24.2)	Hepatocyte nuclear factor 1a	<3% n > 100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsense, missense and splicing mutations</li> <li>• Inactivation of HNF1a</li> </ul>
IL6ST (5q11)	Interleukin 6 signal transducer (gp130)	<3% n > 120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mostly small in-frame deletions</li> <li>• Activation IL6/STAT pathway</li> </ul>
RB1 (13q14)	Retinoblastoma 1	<11% n > 18	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frameshift variants</li> </ul>
CDKN2A (9p21)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	10-60% n > 750	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense in exon 3 and large in-frame deletions</li> <li>• Activation of the Wnt/<math>\beta</math>-catenin signal transduction pathway</li> </ul>
PIK3CA (3q26.3)	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, $\alpha$ polypeptide	<3% n > 200	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variants</li> <li>• Activation of the PI3K/Akt pathway</li> </ul>
SMAD2-4 (18q21)	SMAD family member 2 and 4	<10% n > 30	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variants</li> </ul>
PTEN (10q23.1)	Phosphatase and tensin homolog	<5-10% n > 350	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonsense, frame-shift and splice variants</li> <li>• Inactivation of PTEN</li> </ul>
IGF2R (6q26)	Insulin-like growth factor 2 receptor	0-13% n > 150	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homozygous deletion, missense and splicing variants</li> <li>• Inactivation of IGF2R</li> </ul>
MET (7q31)	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	<1-5% n > 10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variants in tyrosine kinase domain</li> <li>• Activating mutations</li> </ul>
CSF-1R (5q32)	Colony stimulating factor 1 receptor (C-FMS)	2 mutations n > 10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variants</li> <li>• Activating the protein tyrosine kinase (PTK) signal system</li> </ul>
STK11 (19p13.3)	Serine/threonine-protein kinase 11 (LKB1)	1 mutation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Missense variant</li> </ul>

**Tableau 6: Majeures mutations identifiées dans les CHC (à l'exclusion des lignées cellulaires).** (Imbeaud et al., 2010).

Les approches génomiques globales visent à rechercher de nouveaux oncogènes et de nouveaux suppresseurs de tumeur. Les profils transcriptomiques et de microRNA des CHC

sont notamment étudiés pour déterminer de nouveaux sous-groupes de tumeurs et de nouveaux acteurs potentiels dans le processus carcinogénique. Ces classifications basées sur la signature génétique des tumeurs est une approche prometteuse pour l'élaboration de protocoles avec des thérapies ciblées.

#### 4. Diagnostic et prise en charge du CHC

##### a) *Diagnostic*

Les tumeurs du foie sont souvent asymptomatiques pendant une longue période et par conséquent, le diagnostic du CHC chez des patients n'étant pas considéré comme à risque est souvent tardif. Les signes cliniques peuvent être une douleur de l'hypocondre droit, une dégradation de l'état de santé général qui s'accompagne d'une perte de poids et d'une asthénie. Chez les patients à risque, le CHC peut être révélé à l'occasion d'une aggravation de la cirrhose, avec apparition d'une ascite et/ou d'un ictère ou par un hémopéritoine, en raison de la rupture d'un nodule néoplasique. L'objectif chez les patients à risque est de dépister le CHC le plus précocement possible à un stade où celui-ci est curable. Pour cela, il faut que la tumeur soit nodulaire de moins de 5cm de diamètre ou multifocale mais de moins de 3 nodules de moins de 3cm de diamètre chacun, qu'elle ne présente pas d'extension vasculaire notamment portale et qu'il n'y ait pas de métastases extra-hépatiques (Trinchet and Ganne-Carrie, 2006). Actuellement, en raison d'une surveillance accrue des patients cirrhotiques, la découverte de CHC de petite taille encore asymptomatique est de plus en plus fréquente et devient majoritaire.

La cirrhose étant la pathologie hépatique sous-jacente retrouvée chez 80 à 90% des patients de CHC, le diagnostic du CHC est un point fondamental pour les cliniciens lors du suivi des patients cirrhotiques (Talwalkar and Gores, 2004). Les critères de diagnostic sont des investigations non-invasives (échographie, angiographie, IRM,...) même si la sensibilité des techniques est insuffisante pour des nodules inférieurs à 2cm. La biopsie, douloureuse pour le patient, comporte de plus un risque de dissémination néoplasique. Elle est indiquée en cas de tumeur de petite taille ou s'il persiste un doute quant à la nature de la tumeur.

Le dosage de marqueurs tumoraux participe également au diagnostic. L'alpha-foetoprotéine (AFP) a été considérée comme un marqueur de diagnostic de choix de la pathologie. Synthétisée par le foie, l'AFP constitue la protéine sérique prédominante au cours

de la vie fœtale. Elle est graduellement remplacée par l'albumine au cours du développement et son expression est réprimée au niveau transcriptionnel à la naissance. L'AFP est ré-exprimée dans 50 à 80% des patients atteints de CHC et cela se traduit dans plus d'un cas sur trois par une élévation de la concentration circulante d'AFP au moment du diagnostic. L'élévation secondaire au cours du développement du carcinome est beaucoup plus fréquente. Le taux d'AFP circulant peut aussi avoir une valeur prédictive : les patients atteints de CHC et présentant un taux d'AFP circulant d'au moins 400ng/mL ont tendance à avoir des tumeurs de taille plus importante, une thrombose de la veine porte et une médiane de survie plus faible (Tangkijvanich et al., 2000). Actuellement, l'élévation de la concentration circulante d'AFP est considérée comme un marqueur tumoral spécifique mais peu sensible. La valeur seuil de 20ng/mL est la plus communément utilisée pour différencier des patients atteints de CHC d'adultes sains. Cependant de nombreux groupes ont montré que ce seuil fluctuait en fonction des groupes ethniques testés. La meilleure valeur seuil serait 30ng/mL pour la population sicilienne (sensibilité de 65%, spécificité 89%) et 200ng/mL (sensibilité de 70%, spécificité 100%) pour la population birmane (Soresi et al., 2003; Taketa et al., 2002). Bien que l'AFP ait servi de marqueur principal pour le CHC, des études montrent que l'AFP n'est pas augmentée dans les CHC débutants (lésions de 1 à 2cm), que des taux élevés supérieurs à 400ng/mL sont aussi observés chez des patients atteints de cirrhose virale sans preuve d'un CHC et que les faux positifs importants peuvent rendre difficile la distinction entre un CHC différencié et un désordre hépatique bénin (Bae et al., 2005).

Le glypican-3 (GPC3), protéine de la famille des héparanes sulfate protéoglycane, est exprimé dans plus de 80% des CHC. Le GPC3 est détectable dans le sérum de 40 à 50% des patients atteints de CHC mais pas dans les sérums de patients atteints de cirrhose ou d'hépatite chronique ou dans les sérums de patients sains (Nakatsura and Nishimura, 2005). Des études indiquent que la détection de l'AFP et du GPC3 augmente de façon significative la sensibilité du test pour le diagnostic du CHC (Capurro et al., 2003).

## *b) Traitements*

La détermination du stade du CHC selon les classifications de Child Pugh et d'Okuda (cf partie IB3b) sont déterminantes pour le choix du traitement. On peut schématiquement distinguer trois grandes situations (Taieb et al., 2006):

- les traitements dits « curatifs » qui permettent de retirer ou de détruire l'ensemble des lésions néoplasiques ;
- les traitements (néo)adjuvants qui ont pour but d'améliorer les performances des traitements curatifs ;
- les traitements « palliatifs » qui ont pour but d'augmenter la durée de vie en préservant ou en améliorant la qualité de vie des patients chez qui un traitement curatif n'est plus envisageable.

### (1) Curatifs

Dans les traitements curatifs, on peut distinguer les traitements chirurgicaux regroupant la résection hépatique et la transplantation hépatique (TH) et les traitements non-chirurgicaux de radiothérapie et de destruction percutanée.

#### (a) Chirurgicaux

La transplantation hépatique (TH) est le meilleur traitement curatif du CHC sur foie cirrhotique et le seul qui permette le traitement du cancer et de la maladie du foie sous-jacente. Elle est actuellement indiquée pour les patients répondant aux critères de Milan (lésion de diamètre inférieur à 5cm, au plus trois nodules inférieurs à 3cm). Parmi ces patients éligibles, elle permet une survie globale à 10 ans de 70% (Mazzaferro et al., 1996). L'extension des critères de Milan est un sujet polémique actuellement. Cela soulève des questions quant à la gestion du nombre limité de greffons. De plus, cela implique de proposer des traitements avant de réaliser la TH pour améliorer les résultats à long terme ainsi que des traitements pour éviter aux patients de sortir des listes d'attente pour la TH. Ainsi, avant la TH, un traitement par chimio-embolisation ou par destruction percutanée par exemple, peut limiter la progression de la maladie ou rendre transplantable, après une réduction tumorale, des patients qui ne l'étaient pas.

La résection chirurgicale est le traitement privilégié du CHC sur foie non-cirrhotique mais ne peut être envisagée chez le patient cirrhotique que si la fonction hépatique le permet. Elle concerne 5% des cas de CHC en Occident. Ainsi, parmi les patients atteints de CHC cirrhotiques et sans insuffisance hépatocellulaire, seuls sont opérables les CHC de petite taille et d'extension intrahépatique limitée, non compliqués d'une thrombose portale et non métastasés, ce qui représente actuellement moins de 10% des CHC. Les résultats de cette chirurgie sont donc liés au nombre et à la taille des nodules mais aussi à l'hépatopathie sous-

jacente. Ainsi, chez les patients présentant un CHC unique sans hypertension portale ni élévation de la bilirubine, les taux de survie à cinq ans sont de plus de 70% alors qu'ils sont de moins de 20% si un seul de ces critères n'est pas respecté (Llovet et al., 2003). Cependant, le risque de récurrence est important puisque la récurrence tumorale complique 50% des cas à trois ans.

Le traitement chirurgical représente malgré tout la solution la plus efficace (Hasegawa and Kokudo, 2009). Les deux techniques chirurgicales ont été comparées dans le traitement des CHC précoces associés à une cirrhose de stade Child –Pugh, lorsque la taille et le nombre de tumeurs sont inférieurs ou égaux à 4 ou que l'invasion veineuse est absente, il n'y a pas de différence significative de survie entre les deux groupes et la résection hépatique reste alors le traitement de choix ; quand le nombre est supérieur à 4 ou qu'il existe une invasion veineuse, la survie est meilleure pour le groupe transplanté (Zhou et al., 2010).

#### (b) *Non chirurgicaux*

Le traitement percutané est la meilleure option pour les CHC non chirurgicaux. La destruction percutanée du CHC 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 (alcoolisation et l'acétisation) ou par un changement thermique (radiofréquence, cryothérapie ou laser) (Taieb et al., 2009). L'injection percutanée d'alcool absolu est la technique la plus étudiée et permet d'obtenir une réponse complète dans 70% des CHC de moins de 3cm et des taux de survie proches de ceux obtenus par chirurgie (Yamamoto et al., 2001). L'alcoolisation tend à être remplacée par la radiofréquence apparue il y a une dizaine d'années. L'ablation est créée par le passage d'un courant électrique alternatif de haute fréquence dans une aiguille placée dans les tissus tumoraux qui va détruire par thermo-exérèse (70°C-90°C) la tumeur. La réussite du traitement dépend directement de la taille de la tumeur. Ainsi, les meilleurs résultats sont obtenus sur des CHC de 3cm ou moins. Les tumeurs de plus de 5 cm sont plus rarement détruites en totalité et au-delà, la destruction complète n'a lieu que dans 30 à 50% des cas (Taieb et al., 2009).

Plusieurs essais randomisés ont démontré la supériorité de la radiofréquence (RFA) sur l'alcoolisation en terme de contrôle local de la maladie, de survie sans récurrence et de survie globale (Lencioni et al., 2003; Lin et al., 2004). En terme de rapport coût-efficacité, le coût du matériel de radiofréquence semble être compensé par le fait que cette technique soit

réalisée en une seule session thérapeutique limitant ainsi la répétition des hospitalisations coûteuses dans le cas de l'alcoolisation. La cryothérapie et le laser sont des techniques marginales.

Depuis quelques années, les nouvelles approches de radiothérapie permettent d'envisager un traitement des tumeurs intrahépatiques jusque là écartées du fait de la grande radiosensibilité du parenchyme hépatique. Les premiers essais concernent majoritairement des tumeurs de petite taille (< 3 cm) et les résultats en terme de réponse tumorale, de taux de récurrence et de taux de survie sont encourageants (Mornex et al., 2006).

## (2) Adjuvants

Le taux de récurrence du CHC après résection ou destruction percutanée est très élevé, supérieur à 70% à cinq ans (Llovet and Bruix, 2008). Même si actuellement, aucun traitement adjuvant n'est considéré comme standard, des essais de phase III randomisés ont suggéré un bénéfice pour la récurrence tumorale d'un traitement par chimioembolisation et par immunothérapie passive. La validation d'un traitement adjuvant efficace est nécessaire. Actuellement, deux essais sont ouverts en France pour cette indication : l'un pour évaluer la réduction de la récurrence tumorale à 24 mois par administration de lipiodol radioactif après un traitement initial curatif chirurgical ou percutané (essai ANRS HC 06), l'autre pour comparer une chimiothérapie intra-artérielle lipiodolée (esters éthyliques des acides gras couplés avec <sup>131</sup>I) à une chimiothérapie par gemcitabine et oxaliplatine ou à une surveillance simple après résection ou destruction tumorale (essai GEMOXIAL) (Taieb et al., 2009).

Trois essais randomisés ont évalué un traitement adjuvant après TH. L'administration de Licartin® a notamment été associée à une diminution du taux de récurrence et à une prolongation de la durée de survie (Xu et al., 2007). En revanche, un essai de chimiothérapie par doxorubicine en pré-, per- et post-opératoire sur 46 malades s'est révélé inefficace (Xu et al., 2007). Actuellement, la recherche d'un traitement adjuvant efficace du CHC après TH est important notamment parce que la pratique de la TH au-delà des critères de Milan est de plus en plus courante (30% des cas de TH en France) et qu'elle est associée à des taux de récurrence plus élevés.

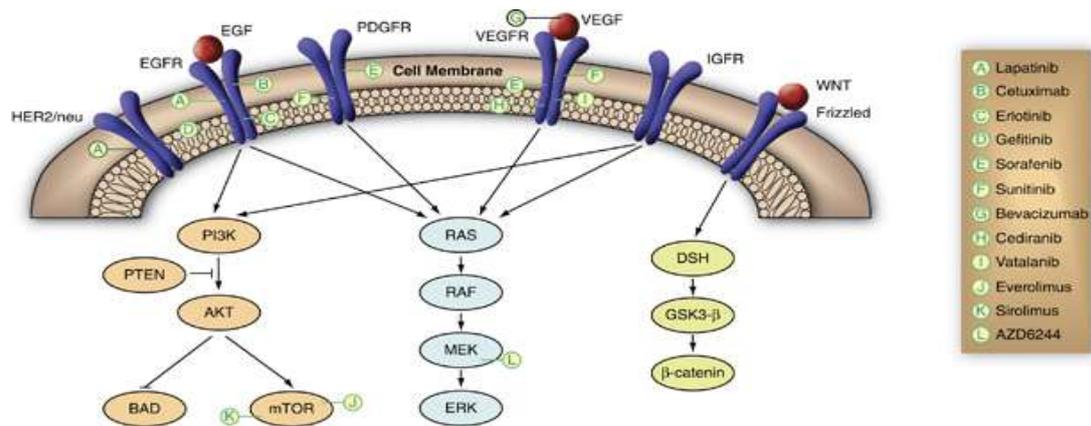
### (3) Palliatifs

Dans les traitements palliatifs, on peut distinguer les traitements intra-artériels (chimio-embolisation et chimiothérapie intra-artérielle), les traitements systémiques comme la chimiothérapie et les traitements thérapeutiques ciblés.

Les traitements intra-artériels sont largement utilisés pour le traitement des CHC non résecables et ne pouvant pas être traités par injections percutanées. Ces techniques consistent en l'injection, via un cathéter placé dans l'artère hépatique, d'agents de traitement de chimiothérapie mélangés ou non à des particules qui embolisent le flux sanguin vers le tissu tumoral. Les agents d'embolisation peuvent être administrés seuls (embolisation) ou après une chimiothérapie intra-artérielle (doxorubicine, mitomycine ou cisplatine) ou en combinaison avec le lipiodol (chimio-embolisation). La chimio-embolisation conduit à une réponse objective dans 16 à 60% des cas et à une nécrose tumorale extensive dans plus de 50% des cas. Deux méta-analyses parues en 2002 et 2003 montrent une augmentation de la survie à deux ans chez les malades traités par rapport aux malades témoins. Les substances utilisées pour la chimiothérapie intra-artérielle hépatique (CIAH) ont été le 5-FU, les anthracyclines et/ou le cisplatine avec des taux de réponse de 15 à 66% (Taieb et al., 2009).

La chimiothérapie par voie systémique donne des résultats très décevants sur le cancer primitif du foie. En monochimiothérapie, la doxorubicine a été la substance la plus évaluée en phase II. Le taux de réponse moyen, évalué sur plus de 500 malades, était de 15% environ et la médiane de survie de trois à quatre mois, pour une toxicité hématologique et digestive importante (Zhu, 2006). Plusieurs polychimiothérapies ont été évaluées pour le CHC en phase II ou en phase III en comparaison avec la doxorubicine seule. Les taux de réponse ont été de 15 à 40% (Zhu, 2006). D'autres traitements systémiques ont conclu à l'absence d'efficacité du tamoxifène, des anti-androgènes et de l'ocrotéotide. D'autre part, des études préliminaires sur l'injection d'IFN- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et de GM-CSF, de cellules dendritiques ou la vaccination par injection de lysats de protéines tumorales ont donné des résultats décevants (Zerbini et al., 2006a).

Enfin, comme décrit précédemment, de nombreuses voies de signalisation sont altérées dans le CHC : voies de survie dépendantes de la voie PI3K/AKT/mTOR, voies de prolifération dépendantes des voies RAF et MAPK, voie WNT- $\beta$ caténine. De nouvelles thérapies ciblées émergent actuellement visant notamment les voies dépendantes des facteurs de croissance hépatocytaires et vasculaires fréquemment activées et pour lesquelles il existe maintenant des inhibiteurs pharmacologiques puissants (**figure 17**).



**Figure 17: Thérapies ciblées disponibles ou en développement pour le traitement du CCHC et cibles moléculaires visées.** (Whittaker et al., 2010).

Les inhibiteurs des récepteurs à l'EGF (EGFR) ont été testés du fait de leur efficacité dans le traitement d'autres tumeurs solides et du fait du rôle important de leurs ligands dans le développement du CCHC. Ces inhibiteurs incluent des inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>, Roche), le lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>, GSK) ou le gefitinib (Iressa<sup>®</sup>, AstraZeneca) et des anticorps monoclonaux comme le cetuximab (Erbix<sup>®</sup>, Merck). Cependant, les résultats des phases II de ces inhibiteurs en monothérapie ne montrent que des taux de réponse marginaux (0 à 9%) et des survies de 9 à 13 mois (Philip et al., 2005; Zhu et al., 2007a). En association avec une chimiothérapie conventionnelle (gemcitabine et oxaplatine), le cetuximab permet d'obtenir les mêmes résultats que la chimiothérapie conventionnelle seule mais sur une population ayant une forme plus grave de CCHC (Asnacios et al., 2008). Les résultats obtenus en monothérapie avec l'erlotinib et le lapatinib sont décevants.

L'expression du VEGF étant augmentée dans le CCHC et dans le foie cirrhotique, des inhibiteurs ont été testés. Le médicament anti-angiogénique de référence actuellement est le bevacizumab (avastin<sup>®</sup>, Roche) qui a été testé dans trois essais de phase II comportant environ 30 patients atteints de CCHC avancés. Les réponses observées en monothérapie ont été modestes confirmant que le ciblage d'une seule voie de signalisation ne permet pas un contrôle suffisant de la maladie tumorale (Taieb et al., 2009).

Certaines molécules multicibles, capables d'inhiber simultanément plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance, ont été évaluées comme le sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>, Bayer) ou le sunitinib (Sutent<sup>®</sup>, Pfizer). Ainsi, l'essai international SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol) a inclus entre mars 2005 et avril 2006, 602 patients

randomisés en deux groupes traités par sorafenib (400 mg deux fois par jour) ou par placebo. Les médianes de survie globale (10,7 mois vs 7,9 mois) et de survie sans progression (5,5 mois vs 2,8 mois) étaient significativement allongées chez les patients traités par sorafenib (Llovet et al., 2008). Cet inhibiteur de protéine-kinases a un double mécanisme d'action. La molécule cible à la fois la cellule tumorale en inhibant la prolifération tumorale par inhibition de la voie RAS/MAPK et l'angiogenèse tumorale en bloquant les récepteurs au VEGF et au PDGF. Une seconde étude de phase III réalisée en Asie a confirmé ces résultats. L'autorisation de mise sur le marché du sorafenib a été délivrée en 2007 pour le traitement palliatif du CHC.

#### (4) Préventifs

Les traitements préventifs visent à lutter contre chacune des étapes aboutissant au développement d'un CHC. La prévention primaire inclut la vaccination contre l'hépatite B des sujets à risque, l'identification chez les donneurs de sang des porteurs de l'hépatite C, la prévention vis-à-vis de l'exposition aux facteurs étiologiques comme l'aflatoxine, la lutte contre l'alcoolisme et le dépistage et le traitement de l'hémochromatose génétique.

La prévention secondaire a pour objectif de dépister précocement le CHC chez les patients porteurs d'une hépatopathie chronique par le dosage systématique de l'AFP et la pratique d'une échographie hépatique tous les six mois.

### C. Immunothérapie des cancers par des stratégies de vaccination génétique

Au cours des deux dernières décennies, l'immunothérapie des cancers a réellement émergé comme une quatrième modalité pour le traitement de la pathologie après les traitements conventionnels que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Parmi les avancées et les découvertes fondamentales qui ont permis cette émergence, on peut citer notamment l'identification des antigènes de rejet tumoral, les connaissances acquises sur le fonctionnement moléculaire et cellulaire de l'immunité et de la tolérance, la connaissance fine de l'immunité innée, la compréhension de la biologie des cellules dendritiques et l'apport de connaissances sur les mécanismes d'échappement tumoral à l'immuno-surveillance (Bergman, 2009).

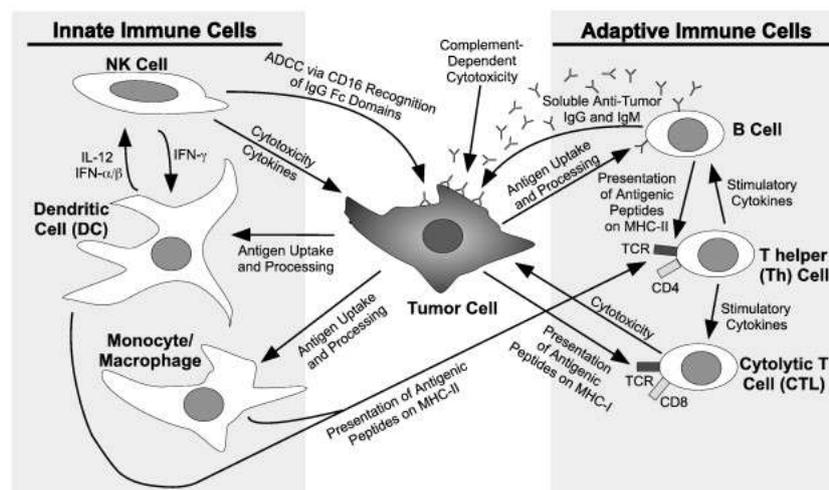
Le postulat sur lequel est basée l'immunothérapie des cancers est le fait que, en plus d'assurer la protection de l'organisme contre des pathogènes infectieux, le système immunitaire a également la capacité de reconnaître et d'éradiquer le cancer. Les thérapies développées cherchent essentiellement à briser la tolérance immunitaire de l'organisme vis-à-vis de la tumeur et à stimuler le système immunitaire, soit par une approche non-spécifique, soit par une approche antigène spécifique. Les principaux types d'approches d'immunothérapie pour le traitement du cancer incluent les approches favorisant l'inflammation par administration directe du BCG dans la tumeur par exemple pour le traitement du cancer de la vessie (Wei et al., 2008), les approches basées sur l'utilisation de cytokines pour amplifier certains types cellulaires de l'immunité (Parmiani et al., 2000), les approches basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Adams and Weiner, 2005), les approches de thérapies cellulaires avec l'injection aux patients de cellules souches ou de lymphocytes spécifiques de la tumeur (Yang et al., 2008) et enfin la vaccination anti-tumorale consistant en l'administration d'antigènes tumoraux soit chargés sur des cellules présentatrices d'antigènes, soit exprimés par des vecteurs viraux (Banchereau and Palucka, 2005; Draper and Heeney, 2010).

Les concepts fondamentaux ainsi que les stratégies de l'immunothérapie des cancers sont ici présentés. Cependant, seule l'approche d'immunothérapie par vaccination génétique grâce à des vecteurs viraux sera développée.

## 1. Concepts fondamentaux de l'immunothérapie des cancers

### a) Acteurs de l'immunité anti-tumorale

Les cellules et l'ensemble des médiateurs du système immunitaire interagissent entre eux pour assurer à l'organisme une protection continue contre les agressions tout en maintenant la tolérance vis-à-vis du « soi ». Classiquement, on distingue deux principales composantes de la réponse immunitaire : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée (ou naturelle) constitue la première ligne de défense de l'organisme. Elle est rapidement mise en place mais n'est pas spécifique. Elle comprend des barrières physiques (peau, épithéliums et muqueuses digestives, bronchiques et urogénitales), une composante cellulaire (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules tueuses NK) ainsi qu'une composante humorale (le complément) et des cytokines qui coordonnent et régulent les cellules de la réponse innée. Cette réponse est suivie d'une réponse adaptative (ou spécifique) qui se caractérise par une mémoire immunologique des pathogènes permettant une destruction plus efficace et plus rapide lors du second contact avec le même agent pathogène. Les constituants de la réponse immunitaire mémoire sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Les cellules T sont caractérisées par leur cluster de différenciation (CD) et leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). On distingue ainsi les cellules T auxiliaires ( $CD4^+$  et CMH de classe II), les cellules T cytotoxiques ( $CD8^+$  et CMH de classe I), les cellules NK et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les deux types de réponse, innée et adaptative, sont liés de par la capacité de la réponse innée à stimuler et à influencer sur la nature de la réponse adaptative et par les mécanismes effecteurs communs entre les deux réponses (**figure 18**).



**Figure 18:** Acteurs cellulaires majeurs des réponses immunitaires innée et adaptative et leurs fonctions vis-à-vis d'une cellule tumorale. (Borghaei et al., 2009).

Brièvement, les cellules de la réponse innée fournissent les réponses les plus rapides par émission de cytokines, lyse directe des cellules anormales par les cellules NK et capture des débris de cellules mortes par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques pour présenter des fragments peptidiques des antigènes spécifiques du « non-soi » aux cellules lymphocytaires T. Les lymphocytes B et T de la réponse adaptative vont générer une réponse spécifique d'un antigène sous un délai de quelques jours nécessaires pour que les sous-populations porteuses des récepteurs spécifiques de l'antigène prolifèrent et se différencient pour générer un grand nombre de cellules effectrices activées et efficaces. Ces événements de prolifération et de différenciation sont induits par des cytokines inflammatoires (IFN- $\gamma$  et IL-12) sécrétées par les cellules activées de la réponse innée et par les cellules T. Les cellules T vont alors directement lyser les cellules tumorales (cellules T cytotoxiques, CTL) ou sécréter des cytokines (cellules T auxiliaires ou helper, Th) tandis que les lymphocytes B vont générer une réponse humorale en sécrétant des immunoglobulines spécifiques de l'antigène.

#### *b) Rationnels de l'immunothérapie des cancers*

Plusieurs éléments attestent de la capacité du système immunitaire à contrôler le développement tumoral. On peut notamment citer les cas de régression spontanée des tumeurs chez des patients n'ayant reçu aucun traitement, la présence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au sein de la tumeur ou dans les ganglions lymphatiques adjacents, la présence de lymphocytes, de monocytes et de plasmocytes dans les infiltrats tumoraux, l'incidence accrue de certains types de cancers chez des personnes immunodéprimées et la description de cas de rémission avec l'utilisation de modulateurs de l'immunité (Bergman, 2009).

##### (1) L'immunosurveillance

Le concept d'immunosurveillance repose sur l'idée que le système immunitaire pourrait activement empêcher le développement néoplasique. Il a été initialement émis par Ehrlich et Coley au début du siècle dernier. Dans les années 1950, Burnet et Thomas ont émis l'hypothèse que les lymphocytes T joueraient un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. Celle-ci a été validée grâce au développement des

techniques de ciblage de gènes et la génération de souris transgéniques invalidées pour l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de la réponse immune. Depuis, de nombreux travaux ont démontré l'implication claire des lymphocytes T dans la réponse immunitaire anti-tumorale (Benchetrit et al., 2003) et notamment, des expériences menées chez l'homme et dans des modèles expérimentaux, montrent que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> constituent des effecteurs essentiels pour le contrôle et l'élimination des tumeurs (Rey et al., 2005). De plus, l'infiltration des tumeurs par des lymphocytes T capables d'éliminer les cellules cancéreuses est désormais clairement admise et des études récentes soulignent l'importance de ces infiltrats lymphocytaires pour l'issue favorable de la maladie et la survie globale du patient (Pages et al., 2010).

## (2) Les antigènes associés aux tumeurs

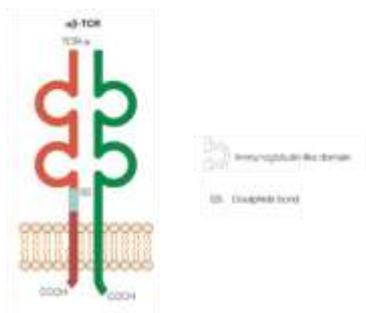
Les altérations génétiques et épigénétiques subies par les cellules tumorales conduisent à une modification de leur profil d'expression génique, aboutissant à l'expression d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) (Pardoll, 2003). La plupart des TAA sont dérivés de protéines du soi qui sont soit mutées, soit exprimées à des niveaux différents dans les cellules saines et les cellules cancéreuses. Les antigènes spécifiques de tumeurs regroupent :

- des produits d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs comme la kinase 4 cycline-dépendante (Wolfel et al., 1995) ou B-raf (Flaherty and McArthur, 2010) exprimées dans les mélanomes ;
- des antigènes des cellules germinales comme les protéines codées par les familles de gènes MAGE-A, -B, -C (Chomez et al., 2001), NY-ESO-1 (Chen et al., 1997) ou SSX (dos Santos et al., 2000). Ces antigènes sont normalement exprimés mais non présentés dans les cellules germinales car celles-ci n'expriment pas de molécules HLA (Fiszer and Kurpisz, 1998) et non exprimés dans les cellules somatiques sauf dans certains cas de carcinogénèse ;
- des antigènes de différenciation comme la tyrosinase, Melan-A/MART-1 ou TRP-1 ou-2 dans le mélanome (Reynolds et al., 1998). La stratégie vis alors à éliminer la tumeur et la cellule différenciée dont elle est à l'origine ;
- des antigènes sur-exprimés comme HER-2/neu dans les cancers du sein ou des ovaires (Fisk et al., 1995) ou PRAME dans les mélanomes (Ikeda et al., 1997). Environ 20% des antigènes tumoraux identifiés sont codés par des gènes considérés comme surexprimés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. La surexpression peut être considérée à l'échelle cellulaire, les cellules tumorales expriment à un niveau plus élevé l'antigène en

question, ou à l'échelle tissulaire, l'antigène est plus exprimé dans la tumeur que dans le tissu sain sans réelle surexpression à l'échelle d'une cellule individuelle (Lucas and Coulie, 2008);

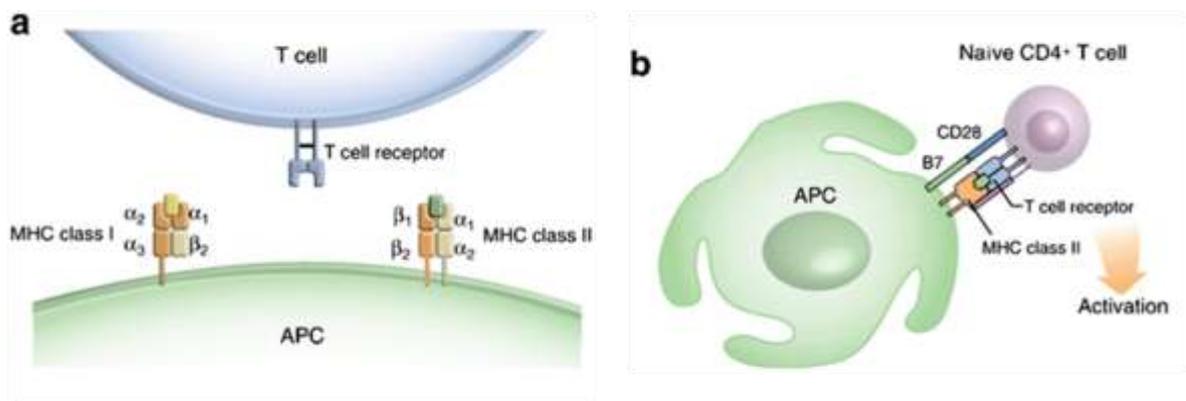
- des antigènes subissant des modifications post-traductionnelles comme MUC-1. Cette glycoprotéine membranaire est surexprimée et présente des glycosylations aberrantes dans de nombreux carcinomes comme ceux du sein, des ovaires, des poumons, du colon ou du pancréas (Bafna et al., 2010) ;
- des antigènes oncofoetaux comme l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) (Duffy, 2001) ou l'alpha-foetoprotéine (AFP) (Evdokimova and Butterfield, 2008). Ces antigènes sont exprimés à des niveaux élevés pendant la vie fœtale et leur expression est réprimée à l'âge adulte. Cependant, la répression de l'expression peut être levée en cas de développement tumoral. Ils sont associés à la prolifération cellulaire et au processus de différenciation ;
- des antigènes oncoviraux produits de la transformation virale des cellules comme les protéines E6 et E7 du papillomavirus humain (Hung et al., 2008). De nombreuses oncoprotéines peuvent ainsi être ciblées dans les processus d'immunothérapie (Fernandez and Esteller, 2010).

Depuis 1991, date de l'identification du premier TAA dans le mélanome (van der Bruggen et al., 1991), plusieurs essais d'immunothérapie active ont été conduits et des preuves expérimentales de la capacité du système immunitaire à reconnaître ces TAA comme cibles et ensuite à détruire les cellules tumorales se sont accumulées au cours des dix dernières années. La détection des TAA par le système immunitaire est surtout réalisée par les lymphocytes T (Andersen et al., 2006). Les lymphocytes T proviennent de la moelle osseuse et migrent dans le thymus pour y subir la maturation. Même matures, lorsqu'ils quittent le thymus, les lymphocytes T sont considérés comme naïfs jusqu'à ce qu'ils soient exposés à l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. En effet, après maturation, les LT expriment un type unique de molécule de liaison à un antigène appelé le récepteur des cellules T (TCR). Ce TCR est constitué de deux molécules transmembranaires, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (**figure 19**).



**Figure 19: Structure du récepteur des cellules T (TCR).** (von Boehmer, 2005).

La grande majorité des TCR reconnaît un complexe qui inclut le peptide antigénique associé à une molécule du CMH. Les molécules du CMH, codées par un groupe de gènes situé sur le chromosome 6 humain, jouent un rôle central dans la reconnaissance et la distinction entre les éléments du soi et les éléments du non-soi. Il existe deux formes majeures de ces glycoprotéines, les molécules CMH de classe I et de classe II. Ces molécules interagissent avec différents co-récepteurs portés par les lymphocytes T, respectivement le CD8 pour le CMH-I et le CD4 pour le CMH-II. Tandis que les molécules CMH-I sont exprimées en surface de presque toutes les cellules nucléées, les molécules CMH-II ne sont exprimées que par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (**figure 20**).



**Figure 20: Reconnaissance par le TCR des antigènes présentés par les molécules CMH.** (a) Schéma de la reconnaissance du complexe CMH-antigène par le TCR ; (b) Mécanismes d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après reconnaissance du complexe CMH-II/antigène. (Andersen et al., 2006).

### (3) Les obstacles de l'immunothérapie

Plusieurs mécanismes moléculaires permettant à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immunitaire anti-tumorale ont été décrits. Ceux-ci peuvent être classés en plusieurs catégories selon qu'ils soient inhérents aux cellules cancéreuses, au microenvironnement tumoral ou aux effecteurs du système immunitaire (**figure 21**).



Ces altérations ont été rapportées dans de nombreuses tumeurs (Restifo et al., 1993). De plus, l'expression des antigènes tumoraux par les cellules tumorales est souvent hétérogène et la diminution d'expression antigénique est corrélée à une progression du cancer tandis que la perte totale d'expression a été décrite comme un mécanisme majeur d'échappement tumoral. Celui-ci a particulièrement bien été décrit chez des patients atteints de mélanome métastatique et traités par un transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de l'antigène MART-1 (Yee et al., 2002). Dans ce cas précis, plus que par une diminution d'expression antigénique, l'échappement tumoral s'explique par l'émergence de variants résistants ne présentant pas le peptide antigénique contre lequel la réponse spécifique s'est établie suite au transfert des lymphocytes. De plus, la modulation ou la perte d'expression de molécules CMH-I est observée dans de nombreux types de tumeurs comme le mélanome, le carcinome colorectal ou le cancer du sein (Aptsiauri et al., 2007). Ce phénomène peut être dû à l'altération de la synthèse de la  $\beta$ 2-microglobuline (déficience totale en CMH-I) ou à des altérations des gènes de CMH comme des pertes chromosomiques, des mutations spécifiques ou des défauts de transcription (diminution du niveau d'expression de molécules de CMH-I). Dans tous les cas, ces phénomènes permettent aux cellules tumorales d'échapper à la lyse induite par les CTL.

D'autre part, les cellules tumorales peuvent aussi être moins susceptibles à la lyse suite à la mise en place de mécanismes de résistance aux fonctions cytotoxiques exercées par les CTL et les NK (El Hage et al., 2008). Deux mécanismes de résistance ont été particulièrement bien décrits, celui impliquant la voie perforine-granzymes et celui impliquant la voie des récepteurs à domaine de mort FAS (Gati et al., 2003). Le premier mécanisme interfère avec les voies de signalisation pro-apoptotiques normalement mises en jeu pour la mort par apoptose des cellules cibles. Il a été montré que la serpine P19/SP16, un inhibiteur cellulaire du granzyme B, constitue un moyen d'échappement à la lyse cellulaire *in vivo* et *in vitro* (Medema et al., 2001). Chez l'homme, cet inhibiteur est exprimé dans 39% des lymphomes T, 27% des lymphomes B et 10% des lymphomes hodgkiniens (Bladergroen et al., 2002). D'autres altérations des voies pro-apoptotiques mitochondriales (surexpression de Bcl2, de Bcl-XL,...) observées dans de nombreux types de cellules cancéreuses sont également susceptibles d'altérer la lyse induite par la voie perforine-granzymes. D'autre part, de nombreuses altérations de la voie du récepteur de mort FAS ont été mises en évidence, comme notamment un défaut d'expression de FAS sur les cellules tumorales ou des niveaux élevés du récepteur FAS soluble (Landowski et al., 1997; Ugurel et al., 2001). Dans tous les

cas, cela limite l'engagement de FAS avec son ligand FASL porté par les cellules immunitaires effectrices et inhibe par la suite l'entrée en apoptose de la cellule tumorale.

(b) *Rôle du microenvironnement tumoral*

Le développement tumoral s'accompagne de signaux pro-inflammatoires, généralement sous forme de sécrétion de cytokines et de chimiokines qui sont par ailleurs les principaux inducteurs des réponses immunitaires innée et adaptative. Malgré cela, le système immunitaire reste souvent tolérant vis-à-vis de l'établissement du cancer. Cela suggère que les tumeurs modulent les réponses inflammatoires empêchant ainsi leur élimination. On peut notamment citer la voie oncogène de Stat3. Cette molécule est exprimée par les cellules tumorales où elle inhibe l'inflammation, favorise la prolifération cellulaire et prévient l'apoptose. La voie Stat3 va de plus inhiber la sécrétion par les cellules tumorales de signaux tels que TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IP10 et RANTES prévenant ainsi la mobilisation d'effecteurs immuns (Wang et al., 2004a). Enfin, Stat3 va inhiber la maturation des cellules dendritiques via l'expression d'IL-10 et de VEGF contribuant ainsi à l'échec de la sensibilisation et du recrutement des lymphocytes T spécifiques de la tumeur (Wang et al., 2004a). De la même manière, la cytokine TGF- $\beta$ , sécrétée par de nombreuses tumeurs humaines, module négativement les réponses immunes anti-tumorales en atténuant notamment l'acquisition de fonctions effectrices des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2005).

(c) *Tolérance du système immunitaire*

La tolérance aux antigènes tumoraux favorise l'échappement des tumeurs au système immunitaire. Il a été montré que des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> présents dans la tumeur sont cytotoxiques *in vitro* envers des cellules tumorales autologues alors qu'ils ne permettent pas de limiter la progression tumorale *in vivo*. Cela suggère l'existence d'une tolérance *in vivo* pour l'antigène tumoral. On distingue quatre principaux mécanismes responsables de la tolérance : l'ignorance, l'anergie, la délétion des lymphocytes T et la suppression par régulation négative.

L'ignorance correspond à l'absence d'activation des lymphocytes T spécifiques naïfs suite à un défaut de présentation de l'antigène tumoral par les cellules dendritiques, soit parce

que celles-ci sont immatures, soit parce qu'elles expriment peu de molécules de CMH-II (Steinman et al., 2003). C'est souvent le cas des DC infiltrant les tumeurs. Différents signaux émis par les cellules tumorales suite à l'activation de Stat3 ou de BRAF par exemple, contribuent à l'inactivation des DC (Sumimoto et al., 2006).

L'anergie lymphocytaire est l'incapacité fonctionnelle des lymphocytes naïfs activés à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par ce même antigène. Ceci est dû à l'absence de signaux de co-stimulation, en effet l'activation complète des lymphocytes T nécessite une reconnaissance entre le TCR et le complexe CMH-peptide ainsi qu'un signal co-stimulateur. Ainsi, une absence d'expression des molécules de co-stimulation comme B7-1 ou B7-2 par les cellules cancéreuses conduirait à une anergie des cellules T et par suite à une importante inhibition de la réponse immune (Appleman and Boussiotis, 2003).

Deux mécanismes sont impliqués dans la délétion des lymphocytes T spécifiques. Le premier repose sur le fait que de nombreuses tumeurs (lymphomes, carcinomes pulmonaires, mélanomes, ...) expriment à leur surface FASL, ligand du récepteur de mort FAS. En l'absence de facteurs de croissance, les cellules tumorales vont ainsi induire l'apoptose des lymphocytes infiltrant les tumeurs suite à la fixation de FASL sur le récepteur FAS porté par les lymphocytes (Igney and Krammer, 2005). Le deuxième mécanisme est la mort lymphocytaire induite par l'activation. Les cellules T activées expriment fortement FASL et cela peut conduire à leur propre mort ou à la mort des cellules T environnantes (Khong and Restifo, 2002). Ainsi, la stimulation continue des lymphocytes T anti-tumoraux pourrait aboutir à la délétion de ces effecteurs immunitaires.

Enfin, les lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$  immunorégulateurs (Treg) font l'objet de nombreuses recherches à l'heure actuelle (Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Cette population lymphocytaire sécrète des cytokines immunosuppressives (TGF- $\beta$  et IL-10) et inhibe par contact l'activation et la prolifération des lymphocytes  $CD4^+$  et  $CD8^+$  spécifiques. L'inhibition des Treg augmente considérablement la réponse immune spécifique dans de nombreux modèles murins et la présence de Treg a été corrélée avec une diminution de la survie de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Curiel et al., 2004). De plus, une déplétion des Treg semble mettre en évidence une population de cellules T  $CD8^+$  spécifiques de la tumeur et de haute affinité (Ercolini et al., 2005).

## 2. Stratégies de l'immunothérapie des cancers

L'immunothérapie vise à activer le système immunitaire dans le but d'éradiquer la tumeur sans affecter les cellules normales. L'objectif des différentes stratégies d'immunothérapie est de générer et de maintenir le potentiel lytique des effecteurs de la réponse immunitaire (lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK). On distingue deux grandes stratégies : l'immunothérapie passive qui regroupe notamment l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques et le transfert adoptif de lymphocytes effecteurs activés *ex vivo* et, l'immunothérapie active ou vaccination qui vise à activer les cellules effectrices *in vivo* (El Hage et al., 2008).

### a) Immunothérapie passive

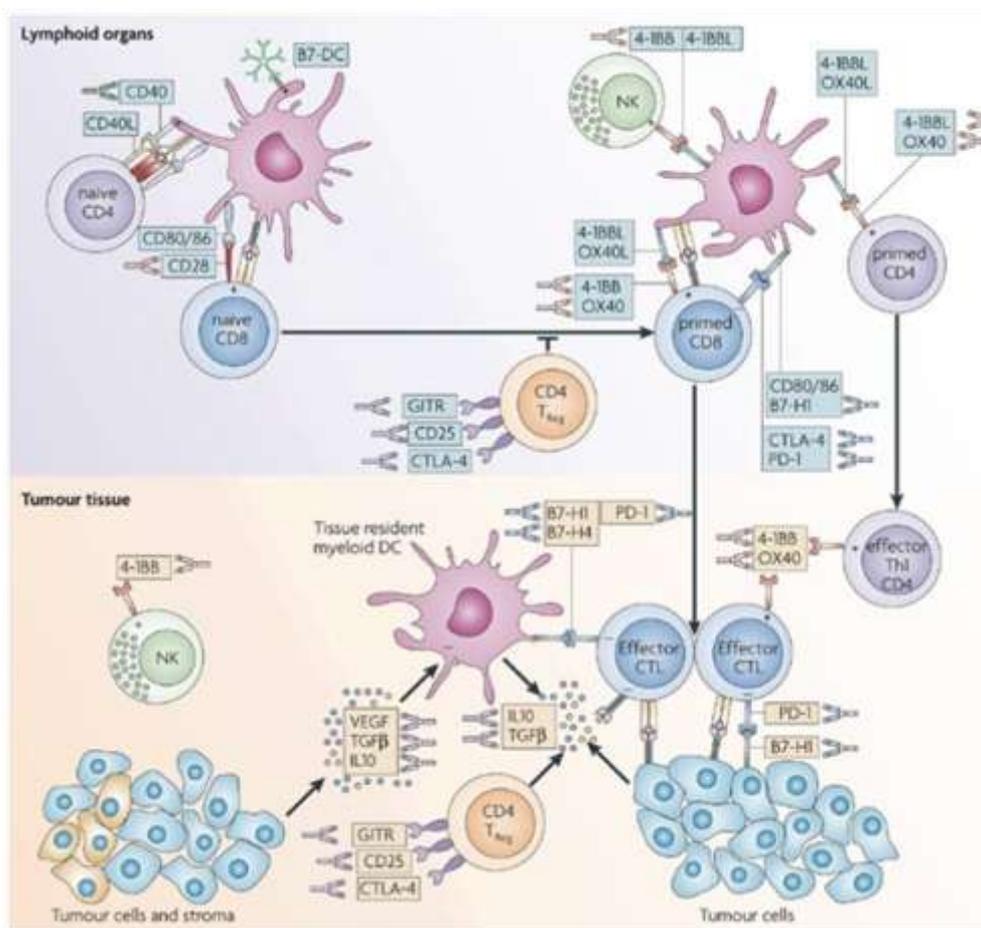
La première approche d'immunothérapie passive visant à augmenter la réponse immune anti-tumorale a consisté en l'administration au patient de molécules immuno-modulatrices. L'administration d'IL-2, activatrice des cellules T et NK *in vivo*, et d'interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) a notamment été utilisée (Dunn et al., 2006; Parmiani et al., 2000). Les inconvénients majeurs de cette approche sont la forte toxicité associée à l'administration massive de ces cytokines d'une part et, d'autre part l'efficacité limitée (**Tableau 7**). Les recherches actuelles ont ainsi pour but de proposer des protocoles avec des doses de cytokines administrées plus faibles ou des protocoles dans lesquels les cytokines sont administrées en adjuvant d'un autre traitement (Smyth et al., 2004).

Cytokine	Clinical application	Response (%)	Notes
IL-2	Melanoma, renal cell carcinoma (RCC)	16 (5)	High-dose regimen
	With peptide vaccine for melanoma	42	Peptide-reactive T cells induced in 91% of patients
	Plus adoptive cell transfer	34 (6)	Partial responses increased over IL-2 alone
IFN- $\alpha$	CML	58 (26)	Better 5-year survival than chemotherapy
	Melanoma	16 (6)	IFN- $\alpha$ -2a and IFN- $\alpha$ -2b of similar effectiveness
	Hairy cell leukemia	82 (4)	Worth considering in patients who fail cladribine first-line treatment
	RCC	18 (2)	Pulmonary metastases more responsive
	Kaposi's sarcoma	31	In combination with anti-retroviral drugs in AIDS patients
TNF- $\alpha$	Colorectal, ocular melanoma	75 (3)	Isolated hepatic perfusion in combination with melphalan
IL-12	With peptide vaccine for melanoma	25 (12)	Increased specific CD8 <sup>+</sup> T-cell responses observed
	Cutaneous T-cell lymphoma	56 (22)	Small study of nine patients
GM-CSF	Reduction of neutropenia following chemotherapy	N/A	May enable use of increased doses of chemotherapy
	GM-CSF-secreting tumor cells for NSCL (Non Small cell lung Carcinoma)	32 SD	Tumor-reactive T cells induced in 82% of patients
Flt3L	Colon, melanoma	N/A	Results in DC mobilization. May be useful in vaccines

CML, chronic myelogenous leukemia; Flt3L, Fms-like tyrosine kinase ligand 3; IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

**Tableau 7 : Utilisation clinique des cytokines chez des patients atteints de cancer.** (Smyth et al., 2004).

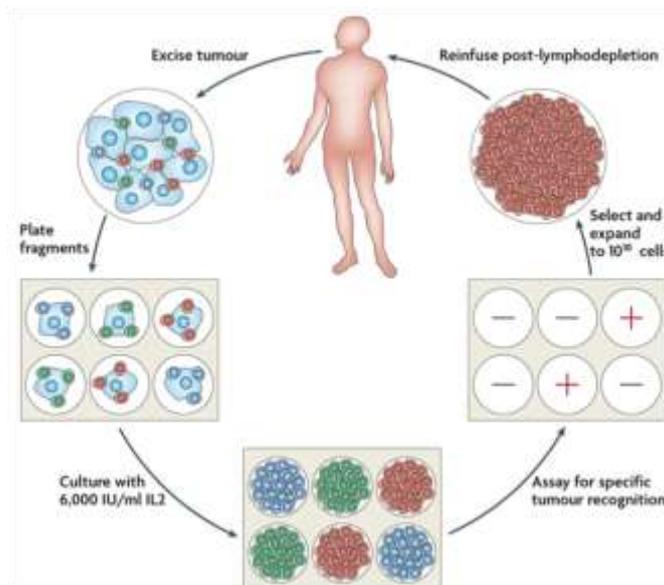
L'immunothérapie passive basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques a déjà montré son efficacité bien que n'étant pas nécessairement associée à une réponse mémoire (Melero et al., 2007). Les anticorps monoclonaux sont spécifiques de leur cible moléculaire et ont la capacité de les activer (anticorps agonistes) ou de réprimer leur fonction (anticorps antagonistes). Ils peuvent ainsi moduler la réponse immunitaire en bloquant des récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) ou en ciblant des récepteurs activateurs de la réponse immunitaire comme 4-1BB ou CD40. En terme d'actions, on peut distinguer les anticorps monoclonaux qui vont interférer avec les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes, ceux qui vont jouer le rôle de ligand agoniste ou super-agoniste de récepteurs de co-stimulation, ceux qui vont favoriser l'activation et/ou la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et, enfin, ceux qui vont inhiber ou déléter les mécanismes immunosuppresseurs comme les cellules Tregs par exemple (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Représentation schématique des points d'actions potentiels des anticorps monoclonaux. (Melero et al., 2007).

Les anticorps monoclonaux anti-CTLA-4, anti-4-1BB et anti-CD40 furent les premiers à être testés en clinique. Le premier est actuellement en essai clinique de phase III pour des patients atteints de mélanome. L'obstacle majeur de leur utilisation en clinique est leur toxicité qui, la plupart du temps, conduit à des cas d'autoimmunité réversible et/ou à des réactions inflammatoires systémiques.

Enfin, il a été montré que dans des modèles animaux, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux pouvait empêcher le développement de cellules cancéreuses greffées et détruire les métastases (El Hage et al., 2008). L'immunothérapie adoptive consiste à identifier et à amplifier *ex vivo* des lymphocytes anti-tumoraux autologues ou allogéniques à partir de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) ou à partir de lymphocytes du sang périphérique, les lymphocytes amplifiés sont ensuite retransférés au patient souvent en association avec des facteurs de croissance pour stimuler leur survie et leur expansion *in vivo* (**figure 24**).



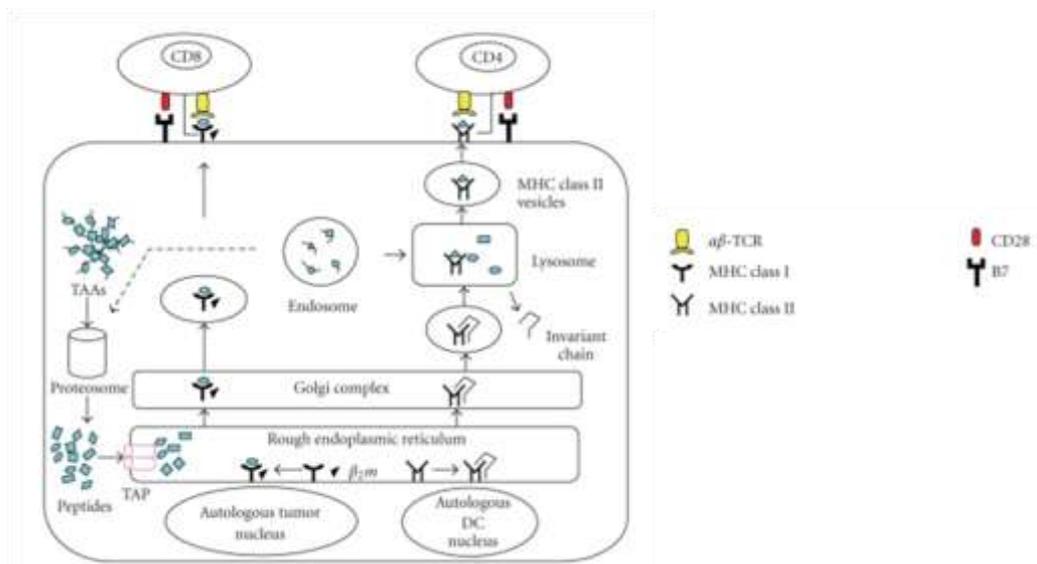
**Figure 24 : Génération de lymphocytes T anti-tumoraux pour le transfert adoptif.** (Rosenberg et al., 2008).

Les cellules réinjectées peuvent être soit une population polyclonale de TIL fortement enrichie en lymphocytes spécifiques de la tumeur, soit une population clonale de lymphocytes T spécifiques. L'immunothérapie basée sur le transfert adoptif de cellules a été décrite en 1988 (Rosenberg et al., 1988) mais la technique est réellement devenue efficace en 2002 lorsque le groupe de Rosenberg a introduit une étape d'immunodéplétion par cyclophosphamide et fludarabine avant le transfert adoptif (Dudley et al., 2002). Ce traitement permet en effet l'élimination spécifique des lymphocytes T régulateurs qui inhibent potentiellement les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette approche d'immunothérapie passive se révèle particulièrement efficace pour le traitement du mélanome puisqu'elle conduit à une régression tumorale dans 50% des cas traités. Les inconvénients de cette approche sont également des cas de toxicité, le développement de maladies auto-immunes et la mise en œuvre longue, coûteuse et spécifique d'un patient. Cependant, des études récentes montrant qu'il est possible de modifier génétiquement des lymphocytes humains normaux pour qu'ils reconnaissent spécifiquement des antigènes tumoraux et pour qu'ils médient une régression tumorale *in vivo*, offrent des perspectives pour développer ces approches de transfert de lymphocytes à des patients porteurs de nombreux types de cancer (Morgan et al., 2006).

### b) Immunothérapie active ou vaccination

L'immunothérapie active a pour but de générer une réponse immunitaire et une expansion des cellules effectrices *in vivo* grâce à l'administration de cellules dendritiques modifiées, de cellules tumorales entières, de lysats tumoraux, de protéines, de peptides ou d'une large variété de vecteurs d'immunisation. La description d'un grand nombre d'antigènes tumoraux depuis les années 1990 a largement contribué au développement de cette approche active.

Les cellules dendritiques sont la cible idéale de la vaccination active puisqu'elles sont de très bonnes cellules présentatrices d'antigènes et qu'elles se distinguent des lymphocytes B et des macrophages par leur expression abondante de molécules co-stimulatrices et par leur capacité à initier une forte réponse primaire (Steinman and Banchereau, 2007). En effet, les DC sont spécialisées dans la capture et la présentation des antigènes tumoraux, par conversion des protéines en peptides présentés par leurs molécules CMH-I et CMH-II. Les DC vont ensuite migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où elles vont initier la réponse antigène-spécifique en présentant le peptide antigénique aux cellules T. Ainsi, les vaccins anti-cancer basés sur l'utilisation des cellules dendritiques font l'objet de nombreuses recherches (Banchereau and Palucka, 2005). Les DC peuvent être chargées *ex vivo* soit avec des peptides synthétiques dérivés d'antigènes tumoraux connus (Celluzzi et al., 1996), soit avec des lysats tumoraux (Nestle et al., 1998), soit avec de l'ARN tumoral (Koido et al., 2000), soit avec des cellules tumorales mortes (Palucka et al., 2006). Les DC peuvent aussi être fusionnées avec des cellules tumorales pour présenter les peptides antigéniques spécifiques de la tumeur aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Koido et al., 2009) (**figure 25**).



**Figure 25 : Fusion de cellules dendritiques et de cellules tumorales autologues.** (Koido et al., 2009).

Bien que des essais cliniques aient démontré une réponse immunologique après une vaccination par des DC chargées avec des peptides tumoraux spécifiques, l'efficacité thérapeutique de l'approche est jusqu'à présent limitée en terme de régression tumorale (Rosenberg et al., 2004). Cependant, de nombreuses optimisations de la vaccination basée sur les cellules dendritiques peuvent être réalisées par exemple en facilitant les interactions entre les réponses innée et adaptative, en limitant l'action des Tregs ou encore en supprimant le micro-environnement tumoral suppressif.

Une autre approche consiste à cibler les cellules dendritiques *in vivo*, ce qui peut se faire par exemple via l'administration de lysats tumoraux ou de peptides. Les peptides peuvent être injectés par voie sous-cutanée, seuls ou associés à des cytokines adjuvantes. Ils sont alors présentés par les molécules de CMH-I des CPA présentes localement. De nombreux travaux visent à améliorer les systèmes de délivrance des peptides antigéniques (Black et al., 2010) et récemment, il a été montré que l'administration de longs peptides synthétiques était particulièrement efficace pour activer les cellules dendritiques et induire une réponse thérapeutique basée sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Melief and van der Burg, 2008).

Enfin, la vaccination active à l'aide de vecteurs d'immunisation fait également l'objet de nombreuses investigations pour le traitement du cancer. Il existe de nombreux types de vecteurs utilisables en immunothérapie des cancers qui seront détaillés dans la partie IC3. Comme pour les approches d'immunisation active détaillées précédemment, un important travail de recherche est fait pour optimiser au maximum la réponse immunitaire induite par les vecteurs d'immunisation. Notamment, en plus d'exprimer l'antigène tumoral, le vecteur peut exprimer des cytokines immuno-modulatrices. Après vaccination, les cellules dendritiques vont présenter les peptides codés par le vecteur aux cellules effectrices.

### c) *Stratégies pour favoriser une réponse immunitaire*

La toxicité des approches d'immunothérapie passive et la faible efficacité des approches d'immunothérapie active chez l'homme imposent une amélioration des protocoles pour le traitement des cancers. En effet, jusqu'à présent hormis pour le traitement du mélanome humain et des cancers différenciés de la prostate, les réponses cliniques obtenues chez l'homme sont décevantes par rapport aux résultats d'immunothérapie obtenus sur des modèles animaux. Cependant, bien que les essais cliniques n'aient pas abouti aux résultats escomptés, ils ont permis de valider la faisabilité et le concept de l'approche par

immunothérapie et ont mis en évidence l'efficacité de la vaccination en terme d'induction des réponses T cytotoxiques chez l'homme même si elles ne s'accompagnent que dans de rares cas d'une réponse clinique objective (Rosenberg et al., 1998b). Les aspects logistiques ont également pu être mis en place.

De nombreuses stratégies sont donc actuellement mises en œuvre pour améliorer les résultats de l'immunothérapie chez l'homme. Premièrement, les recherches visent à améliorer l'induction de l'immunité anti-tumorale spécifique, notamment en travaillant sur la conception du vaccin mais aussi sur la séquence protéique à présenter. En effet, une combinaison de l'antigène spécifique et de cytokines immuno-modulatrices ou la présentation de différentes formes de l'antigène ou de plusieurs antigènes peuvent être envisagées. Par exemple, de meilleurs résultats cliniques ont été obtenus lors de l'injection simultanée de plusieurs épitopes (Fay et al., 2006). La nature de la cellule cible est également à prendre en compte et notamment, l'existence de cellules souches tumorales nécessite de nouvelles approches thérapeutiques prenant en compte leur rythme plus lent de divisions et le fait qu'elles expriment les protéines de la famille ABC responsables de la résistance à de nombreuses drogues anti-cancéreuses. Il a été montré que chez la souris, des DC chargées avec des cellules souches sont beaucoup plus efficaces dans l'inhibition de la croissance d'un gliome que des DC chargées avec des cellules tumorales classiques (Pellegatta et al., 2006).

Une autre stratégie est d'augmenter la qualité et la quantité de lymphocytes T spécifiques au niveau du site tumoral en améliorant la stimulation des CPA *in vivo* avec de nouveaux adjuvants par exemple ou en induisant un environnement inflammatoire au niveau du site tumoral favorable pour le recrutement des lymphocytes effecteurs.

Evidemment, tous les mécanismes d'échappement tumoral sont des pistes pour de nouvelles stratégies. Une des pistes est le ciblage des médiateurs impliqués dans les phénomènes d'immuno-suppression comme IDO, le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 par exemple. Une autre piste qui fait l'objet de nombreuses recherches est l'inhibition ou l'élimination des cellules T régulatrices en bloquant par exemple le récepteur CTLA-4 (Hodi et al., 2003).

Enfin, le décalage entre les espoirs et les résultats réels de l'immunothérapie chez l'homme peut s'expliquer d'une part par l'ensemble des mécanismes d'échappement des tumeurs au contrôle du système immunitaire décrits dans la partie IC1b3 et d'autre part, par le choix des patients pour l'instant traités par immunothérapie. En effet, sur ce deuxième point, les résultats pré-cliniques et cliniques publiés jusqu'à présent soulignent la faible immunogénicité des tumeurs mais également le recours tardif aux techniques d'immunisation

en monothérapie (El Hage et al., 2008). Généralement, l'immunothérapie est actuellement proposée à des patients ayant déjà subi des traitements conventionnels et n'ayant plus d'autres alternatives thérapeutiques et chez qui, souvent, des variants résistants déficients pour l'expression des molécules CMH ont émergés et qui présentent une masse tumorale trop développée pour que les effecteurs cellulaires l'éradiquent. Ainsi, les conclusions des premiers essais cliniques suggèrent que le choix des patients est un facteur critique et que l'approche par immunothérapie pourrait avoir plus de succès lorsque celle-ci est testée plus précocement dans le but de prévenir ou de traiter les récurrences précoces de cancer. Il est de plus probable que comme pour les autres traitements du cancer, les meilleurs résultats soient obtenus dans le cadre d'une approche complémentaire en combinant l'immunothérapie aux autres thérapies conventionnelles. Il a déjà été montré que l'irradiation à faibles doses des tumeurs les sensibilise aux réponses immunitaires induites par les vaccins (Reits et al., 2006). Enfin, certaines chimiothérapies (melphalan et mitomycine C) augmentent l'expression de molécules de co-stimulation (B7-1 et B7-2) permettant ainsi une meilleure présentation antigénique des cellules tumorales (Sojka et al., 2000).

### 3. Cas de la vaccination génétique

Le concept de la vaccination thérapeutique contre le cancer n'est pas nouveau et a évolué des premières approches non-spécifiques du Dr Coley (Hoption Cann et al., 2003) vers des approches de plus en plus spécifiques des tumeurs. L'identification et la caractérisation assez récente des gènes codant pour des antigènes associés aux tumeurs ont permis le design de vaccins contre le cancer spécifiques d'un antigène basés sur des vecteurs d'expression viraux ou non. Ces vecteurs peuvent induire une réponse anticorps et activer une réponse CD4<sup>+</sup> mais sont surtout particulièrement adaptés pour déclencher une réponse CD8<sup>+</sup> puisqu'ils vont permettre l'expression intracellulaire de l'antigène et ainsi le rendre directement disponible pour le processus de présentation sur des molécules CMH-I (Anderson and Schneider, 2007).

a) *Vecteurs de l'immunothérapie des cancers*

(1) Vecteurs non viraux

(a) *ADN nu*

Les vecteurs à ADN sont basés sur des plasmides bactériens construits pour exprimer l'antigène spécifique d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur actif dans la majorité des cellules de mammifères. Ils sont particulièrement efficaces pour l'expression de leur transgène dans la peau (Hengge et al., 1995) et le muscle squelettique (Wolff et al., 1990). Depuis les années 1990, il a été montré dans de nombreux modèles animaux de maladies infectieuses et de cancer, que l'injection directe d'ADN plasmidique dans la peau ou le muscle permettait la production d'antigènes *in situ* et l'induction d'une réponse immunitaire protectrice.

Le mode d'action de ces vecteurs se compose de deux étapes. Premièrement, l'antigène codé par le plasmide est exprimé dans les cellules de l'hôte, soit dans des cellules présentatrices conduisant à une induction directe de la réponse immunitaire, soit dans des cellules non présentatrices d'antigènes qui vont transférer celui-ci aux CPA pour une présentation croisée. Deuxièmement, comme les plasmides ADN dérivent de bactéries, la présence de séquences bactériennes riches en motifs CpG non-méthylés sur le plasmide va induire une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire innée par interaction avec le TLR-9 (Toll like receptor) (Liu and Ulmer, 2005). Cette réponse non-spécifique augmente la réponse immunitaire spécifique de l'antigène. L'avantage des plasmides ADN est qu'ils sont faciles à générer et à produire. De plus, de nombreuses informations indiquent que les produits biologiques basés sur des plasmides à ADN sont sans risque (Schalk et al., 2006) et plusieurs d'entre eux sont actuellement testés dans des phases avancées d'essais cliniques.

Le principal inconvénient cependant est la faible immunogénicité de ce vecteur lorsqu'il est administré sans formulation par voie intra-musculaire. En effet, d'importantes quantités (5-10 mg) sont nécessaires pour induire une immunogénicité qui reste modeste (Graham et al., 2006). Les principales approches testées pour contrer ce problème sont le choix de nouvelles routes d'administration, l'addition d'adjuvants et de nouvelles formulations.

*(b) Vecteurs synthétiques*

Les vecteurs synthétiques ont été développés pour améliorer l'efficacité de la vaccination ADN. Les différentes approches pour mettre au point des vecteurs synthétiques performants ont pour but de condenser le matériel génétique pour le protéger de la dégradation plasmatique, d'assurer un adressage spécifique aux cellules cibles, d'augmenter la quantité d'acides nucléiques délivrés dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire, de réduire la quantité d'ADN à injecter et/ou de permettre une expression continue ou contrôlée du transgène. Les vecteurs développés sont principalement des polymères cationiques, des dendrimères et des liposomes.

Les polymères cationiques ou polyplexes sont des molécules riches en amines, en lysines, ou en arginines. Ces groupements protonés à pH physiologique permettent une association avec l'ADN par des interactions électrostatiques multiples. Ces polymères cationiques assurent la condensation de l'ADN (Dunlap et al., 1997) et favorisent l'interaction avec la membrane plasmique par l'interaction avec les protéoglycanes présents sur la face externe de la membrane. L'inconvénient majeur de ce type de vecteur synthétique est que l'injection de lipides ou de polymères cationiques par voie systémique est décevante. Ils activent en effet souvent le complément et sont par suite rapidement détruits par le système phagocytaire (Plank et al., 1996).

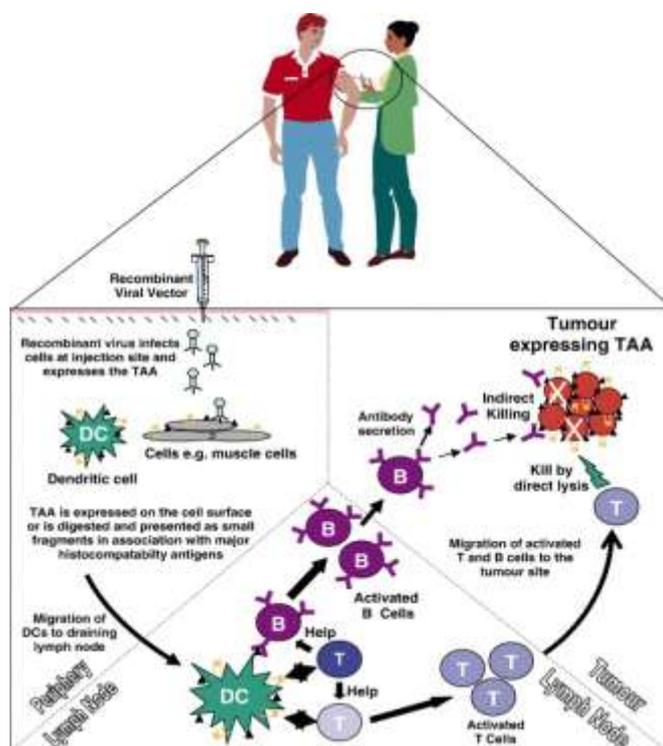
Les dendrimères sont des macromolécules constituées de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central. Le dendrimère prend généralement une forme sphérique hautement ramifiée. Ce vecteur est plurifonctionnel grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie et lui assurant des propriétés particulières de solubilité, de viscosité et de stabilité thermique. Les dendrimères sont capables d'interagir avec plusieurs molécules d'ADN par interaction de charges pour former des complexes stables. Ils présentent une bonne solubilité dans les milieux aqueux et une faible toxicité. Une fois dans le cytoplasme, la condensation va conférer à la molécule d'ADN une résistance à la digestion par les nucléases tout en permettant la transcription du transgène d'intérêt (Bielinska et al., 1997).

Les liposomes ou lipides cationiques sont des molécules monomériques amphiphiles composées de trois parties : une tête polaire chargée positivement et se liant à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison appelé espaceur et séparant les deux éléments. Les liposomes se présentent donc comme des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques séparant un milieu intra-vésiculaire aqueux du milieu extérieur.

Différents liposomes ont été créés et évalués. Ils sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques qui les compose. D'une manière générale, les liposomes neutres ou anioniques ont une efficacité de transfection moindre *in vivo* et les liposomes cationiques sont plus employés *in vivo* que les autres formulations liposomales.

## (2) Vecteurs viraux

Vingt-cinq ans après la première publication de l'utilisation d'un virus recombinant pour l'expression d'un transgène dans un but de vaccination (Moss et al., 1984), un grand nombre de vecteurs viraux recombinants ont été évalués comme vaccins contre le cancer dans des modèles précliniques. Malgré des débuts prometteurs et un développement important des recherches, la liste des vecteurs viraux utilisables en vaccination chez l'homme est limitée. Les vecteurs viraux recombinants, de part leurs propriétés naturelles, vont pouvoir infecter les cellules hôtes, y exprimer le transgène d'intérêt et permettre sa présentation sur des molécules CMH-I (figure 26).



**Figure 26 :** Représentation schématique de l'induction d'une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre la tumeur suite à une vaccination avec un vecteur viral exprimant un antigène tumoral. (Harrop et al., 2006a).

La stratégie de construction de ces vecteurs viraux recombinants consiste à insérer dans le génome viral, la cassette d'expression codant pour le transgène d'intérêt et éventuellement des adjuvants. De plus, ces vecteurs viraux vont induire une forte réponse immunitaire innée facilitant le recrutement des cellules T spécifiques de l'antigène via des mécanismes dépendants ou indépendants du TLR (Zhu et al., 2007b). Ainsi, une propriété clé d'un bon vecteur viral est sa capacité à délivrer efficacement l'antigène cible aux CPA de manière à induire une réponse immunitaire puissante. Il est de plus intéressant d'induire une réponse cellulaire et humorale à long terme.

Enfin, le génome des virus a été largement modifié afin de supprimer les séquences permettant sa réplication et responsables de sa virulence. Le virus ainsi modifié conserve sa capacité de pénétration dans les cellules et donc sa capacité à produire le transgène d'intérêt mais sans pouvoir produire de particules virales (Kay et al., 2001).

#### (a) *Adénovirus*

Bien que les adénovirus aient été largement testés comme vecteur d'expression en thérapie génique, leur utilisation en vaccination contre le cancer a été plus limitée. Les adénovirus recombinants peuvent être produits à des titres élevés ( $10^{11}$  à  $10^{12}$  particules infectieuses/mL) et possèdent un large spectre d'infection *in vitro* et *in vivo* (Benihoud et al., 1999). Les particules adénovirales ne sont généralement pas inactivées par le complément. Les dernières générations de vecteurs adénoviraux possèdent une grande capacité d'insertion hétérologue (jusqu'à 11 kb), sont moins immunogènes car entièrement dépourvues de séquences virales et permettent une expression du transgène à plus long terme. Ce sont de plus des virus non-intégratifs ce qui limite le risque d'activer des séquences oncogènes endogènes. Le principal inconvénient des vecteurs adénoviraux est leur toxicité importante à fortes doses (Christ et al., 2000). Le caractère transitoire de l'expression du transgène est dû à l'immunogénicité du vecteur adénoviral. Chez l'homme, une immunité est acquise durant l'infection naturelle par les adénovirus pendant la petite enfance et conduit à la présence d'anticorps neutralisants limitant l'efficacité des ré-administrations. Pour atténuer la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur, l'expression de molécules immuno-modulatrices ou la vaccination avec des types d'adénovirus rares peuvent être envisagées (Holterman et al., 2004).

*(b) Herpes simplex virus*

L'herpès simplex virus est un vecteur prometteur pour l'expression d'antigènes associés aux tumeurs du fait de sa capacité à infecter à la fois des cellules quiescentes ou en division et de sa capacité à accepter de grands inserts (plus de 50 kb). Alors que des interrogations sur sa sécurité d'utilisation existaient, l'utilisation de vecteurs HSV défectifs pour la réplication par mutation ou délétion rend désormais son utilisation peu risquée. Sous sa forme déficiente, ce vecteur est désormais considéré sûr (Rainov, 2000). Des techniques efficaces de production de lots purifiés de vecteurs HSV non déficients pour la clinique existent déjà.

*(c) Poxvirus*

La famille des poxvirus rassemble des virus qui infectent aussi bien l'homme que les animaux et est une des familles de virus les plus largement étudiées. Elle est divisée en deux sous-familles : celle des *Chordopoxviridae* infectant les vertébrés et celle des *Entomopoxviridae* infectant les insectes. Les poxvirus sont des virus à ADN double brin, enveloppés qui se répliquent dans le cytoplasme des cellules hôtes. Les orthopoxvirus, qui infectent les Mammifères et les avipoxvirus, qui infectent les oiseaux, sont les poxvirus les plus largement étudiés pour l'immunothérapie du cancer. Les poxvirus recombinants présentent de nombreuses caractéristiques qui les rendent intéressants en tant que vecteur de vaccination : leur grande stabilité notamment lors des processus de congélation/décongélation (Collier, 1955), leur faible coût et leur facilité de production et d'administration (Gherardi and Esteban, 1999), leur capacité à induire à la fois une réponse de type anticorps et une réponse T cytotoxique à long terme contre un transgène après une unique injection (Smith et al., 1983a; Smith et al., 1983b) et la possibilité d'insérer de l'ADN exogène (jusqu'à 25kb) (Perkus et al., 1991). Immunologiquement, la forte réponse T cytotoxique induite par les poxvirus par l'intermédiaire d'une forte sécrétion d'IFN- $\gamma$ , en fait des vecteurs de choix pour la vaccination contre le cancer. Enfin, la présence d'une réponse humorale pré-existante (anticorps neutralisants) ne semble pas affecter l'efficacité de ces vecteurs lors d'une ré-administration (Ramirez et al., 2000b). La réplication des avipoxvirus est restreinte aux espèces aviaires et ils ont été isolés à partir de nombreuses espèces (fowlpox, canarypox, pigeonpox, penguinpox,...). Les souches sauvages peuvent être responsables de graves pathologies chez leurs hôtes naturels. Les souches atténuées d'avipoxvirus ont largement été utilisées pour la

vaccination des volailles et sont obtenues après de nombreux passages sur des fibroblastes d'embryons de poulet. Des souches atténuées de fowlpoxvirus (FPV) comme la souche TROVAC ou de canarypoxvirus comme la souche ALVAC ont été très largement testées pour démontrer leur sécurité dans un grand nombre d'espèces animales et chez des hommes sains et immunodéprimés (Pastoret and Vanderplasschen, 2003). Ainsi, bien que leur multiplication soit restreinte aux espèces aviaires, il est démontré que ces avipoxvirus atténués sont très efficaces et extrêmement sûrs d'utilisation comme vecteurs chez les Mammifères et qu'ils sont capables d'induire une réponse immune T (Paoletti, 1996).

Le genre des orthopoxvirus regroupent la plupart des poxvirus causant des maladies chez l'homme dont le smallpox, le monkeypox, le cowpox et le virus de la vaccine. Ce dernier, décrit par Jenner au 18<sup>ème</sup> siècle a été utilisé comme vecteur de vaccination pour éradiquer la variole. En 1991, un premier antigène tumoral humain, l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), est exprimé dans le virus de la vaccine pour une vaccination contre le cancer du colon murin (Kaufman et al., 1991). Alors que les premiers essais de vaccination ont été faits avec des souches de la vaccine compétentes pour la réplication (Gulley et al., 2002), elles ont été remplacées depuis par des souches dérivées atténuées non répliquatives comme la souche NYVAC (Tartaglia et al., 1994) (Tartaglia et al., 1992) ou la souche MVA (Modified Virus Ankara) (Sutter and Moss, 1995). Ces deux souches ont été par la suite largement utilisées pour l'expression de gènes recombinants.

### *b) Optimisation des protocoles de vaccination génique*

Les approches de vaccination génétique avec des vecteurs viraux présentent des avantages par rapport à d'autres stratégies d'immunisation puisque ces vaccins vont mimer l'antigénicité des organismes infectieux dont ils sont issus pour favoriser la réponse immunitaire contre un antigène spécifique. Dans ce contexte, les vecteurs à ADN et les vecteurs viraux recombinants décrits précédemment, notamment ceux incapables de se répliquer dans les cellules de Mammifères (FPV, MVA), sont des vecteurs de vaccination particulièrement intéressants. Ces constructions virales sont en effet, non répliquatives, stables et relativement faciles à produire. Elles sont de plus capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale due à leur capacité à introduire le transgène d'intérêt dans le système de présentation antigénique de la cellule infectée. De nombreuses études animales ont déjà démontrées l'immunogénicité des approches vaccinales avec des vaccins ADN ou

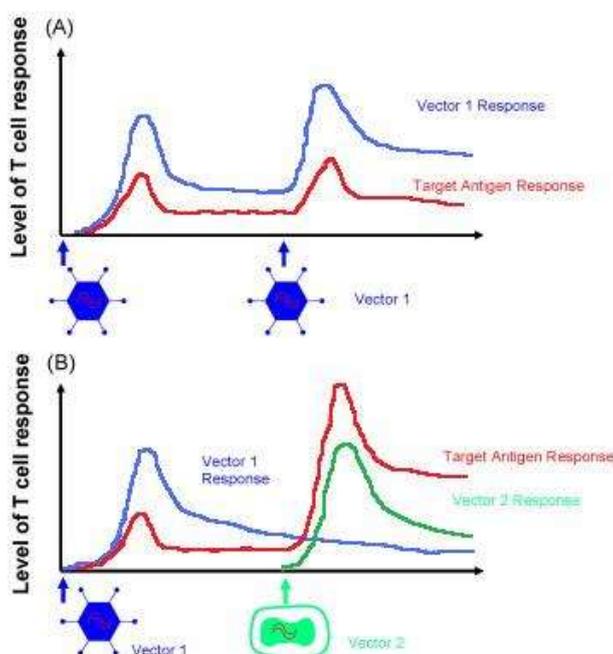
des vecteurs viraux atténués et des essais cliniques sont également en cours. Cependant, malgré ces résultats encourageants, les niveaux de réponse immunitaire spécifique déclenchés par certains de ces vecteurs se révèlent parfois insuffisants pour contrôler ou empêcher le développement tumoral. Ainsi, de nombreuses stratégies sont employées pour améliorer les réponses obtenues lors de la vaccination génétique.

Une première stratégie est de faire exprimer, en plus du transgène d'intérêt, des adjuvants dans le vecteur pour favoriser la réponse immunitaire. Les adjuvants biologiques sont ajoutés dans la formulation du vaccin pour favoriser l'immunogénicité de l'antigène. Plusieurs cytokines peuvent favoriser la réaction immunitaire soit en promouvant la différenciation, l'activation ou le recrutement des CPA favorisant ainsi la présentation antigénique et l'activation d'une réponse T spécifique (GM-CSF par exemple), soit en agissant directement sur certaines populations T (IL-2, IL-7, IL-12, IL-15).

Une autre stratégie est de faire exprimer des versions modifiées du transgène d'intérêt ou alors de faire exprimer l'antigène d'intérêt d'une autre espèce pour faire de la xénoimmunisation. Le design du vecteur de vaccination est particulièrement malléable et, en plus d'ajouter des adjuvants, le travail de biologie moléculaire peut permettre d'exprimer les transgènes sous des formes solubles, transmembranaires et sécrétées. Notamment, il semble que certains antigènes soient plus immunogènes lorsqu'ils sont en position transmembranaire (Hareuveni et al., 1990). D'autre part, de nombreux vaccins xénogéniques ont été développés et testés. Le but est de faire exprimer le transgène d'intérêt d'une espèce différente que l'espèce que l'on souhaite vacciner. Les nombreux essais réalisés sur les modèles animaux ont permis de démontrer que l'expression d'une séquence xénogénique du transgène permettait de surmonter la tolérance immunitaire ou l'ignorance souvent en place pour un antigène du soi. En effet, malgré la forte homologie de séquence antigénique entre deux espèces, des différences mêmes très fines entre les épitopes qui en résultent peuvent permettre de surmonter la tolérance ou l'ignorance (Srinivasan and Wolchok, 2004).

Une troisième stratégie particulièrement développée est l'utilisation de protocole d'immunisation combinant différents vecteurs. On parle d'une approche « prime-boost » hétérologue. L'idée était à l'origine de surmonter la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur de vaccination survenant lors de vaccinations multiples tout en maximisant la réponse immunitaire contre l'antigène d'intérêt. La capacité des protocoles de prime-boost hétérologue à induire une forte réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique de l'antigène a été confirmée dans des modèles pré-cliniques chez les rongeurs (Pasquini et al., 2002), les ruminants (Pasquini et

al., 2002) et les primates non-humains (Amara et al., 2002). Les protocoles d'immunisation par prime-boost exploitent la capacité du système immunitaire à générer une forte réponse T spécifique de l'antigène après un priming initial. En effet, suite à une première immunisation, la population T spécifique de l'antigène est activée et s'accroît modestement. Au cours du temps, une partie de ces cellules va constituer le groupe de cellules T mémoires pour l'antigène. Or, ces cellules mémoires ont la capacité de s'expandre rapidement en cas de nouvelle présentation avec l'antigène pour lequel elles sont spécifiques. Lors d'un prime-boost hétérologue, parce que les vecteurs d'immunisation sont différents, les cellules T dirigées contre le vecteur ne sont pas stimulées lors de la vaccination de rappel ce qui favorise l'expansion des cellules T spécifiques de l'antigène (Schneider et al., 1999) (**figure 27**).



**Figure 27 : Amplification de la réponse T antigène spécifique dans des protocoles de prime-boost homologue (A) et hétérologue (B) avec des vecteurs viraux.** (Anderson and Schneider, 2007).

De nombreux tandems ont été testés aussi bien dans les modèles animaux que chez l'homme comme une vaccination ADN-MVA, ADN-NYVAC, FPV-MVA ou Adénovirus-MVA (Draper and Heeney, 2010). De ces nombreuses études, il apparaît que certains vecteurs sont plus aptes à induire la réponse tandis que d'autres sont plus aptes à la stimuler. Ainsi, les vecteurs ADN et FPV sont des bons vecteurs de priming tandis que les poxvirus (MVA et NYVAC) sont efficaces pour booster une réponse T déjà induite (Schneider et al., 1998; Sullivan et al., 2000). Concrètement, booster une réponse primaire avec un vecteur viral

hétérologue induit une réponse T quatre à dix fois plus importante que celle induite par un boost homologue avec le même vecteur ADN (Anderson and Schneider, 2007).

### *c) Aperçu des essais cliniques*

Au cours de la dernière décennie, le développement en phase clinique de nombreux vaccins contre le cancer a permis de montrer que la majorité d'entre eux étaient sans risques pour les patients et quelques uns ont établi une efficacité clinique dès les premières étapes du développement clinique. Douze vaccins thérapeutiques contre le cancer sont actuellement en phase III de développement aux Etats-Unis ou en Europe (2009).

Sur les nombreux vaccins ADN candidats développés, seuls quelques uns d'entre eux ont été évalués dans des essais cliniques. Une étude pour estimer la toxicité et l'immunogénicité de plasmide ADN exprimant l'antigène CEA et l'antigène HBsAg du virus de l'hépatite B a été réalisée (Conry et al., 2002). Des immunisations répétées induisent une réponse anticorps contre HBsAg mais pas contre l'antigène CEA et n'engendrent pas non plus de réponses cliniques significatives. Un autre essai de vaccination ADN intradermique ou intramusculaire avec un plasmide ADN exprimant l'antigène gp100 du mélanome n'a pas permis d'engendrer une réponse T spécifique (Rosenberg et al., 1998a). Ces deux exemples illustrent le fait qu'une vaccination intradermique ou intramusculaire avec un plasmide ADN sans formulation et sans combinaison avec d'autres vecteurs n'engendre qu'une faible immunogénicité chez les patients traités.

Des adénovirus recombinants exprimant les antigènes MART-1 ou gp100 ont été utilisés pour vacciner des patients atteints de mélanome (Rosenberg et al., 1998a). Un patient sur seize a montré une réponse clinique. Cependant, des forts niveaux d'anticorps neutralisants dirigés contre l'adénovirus ont été détectés dans le sérum des patients avant le traitement, ce qui pourrait expliquer la faible réponse immunitaire induite contre l'antigène du mélanome. Cette faible réponse immunogène a également été observée dans une étude de phase I où un adénovirus exprimant l'antigène L523S spécifique du cancer du poumon était injecté pour booster une première vaccination avec un plasmide ADN (Nemunaitis et al., 2006). Cette étude conclut sur la sécurité d'utilisation de l'adénovirus recombinant mais les preuves d'une activation immunitaire contre l'antigène L523S sont limitées.

Un vecteur HSV oncolytique exprimant le GM-CSF en l'absence du gène de virulence ICP35 a induit des réponses cliniques dans de nombreuses pathologies cancéreuses. En effet, l'injection d'OncoVEX<sup>GM-CSF</sup> a engendré une nécrose tumorale et une inflammation chez la majorité des patients traités ainsi qu'une infiltration de cellules T et de macrophages signes d'une réponse immunitaire anti-tumorale (2010). Un essai clinique de phase III est en cours pour le traitement de mélanomes non-résecables de stades III et IV (Kaufman and Bines, 2010).

Plusieurs MVA recombinants sont actuellement testés en clinique pour différentes indications et de nombreux essais ont déjà établi que les MVA recombinants seuls ou en combinaison avec de la chimiothérapie sont immunogéniques chez des patients atteints de cancer. Ces essais sont présentés dans la partie IE3.

## **D. Carcinome hépatocellulaire et immunothérapie active spécifique d'un antigène**

### **1. Rationnel du traitement du CHC par immunothérapie active**

La preuve de concept de l'efficacité de l'immunothérapie a été clairement établie pour des tumeurs solides comme le mélanome (Clemente et al., 1996) ou le cancer des ovaires (Zhang et al., 2003) pour lesquelles l'infiltration de cellules T dans la tumeur est corrélée à un bon pronostic clinique. Plusieurs de ces résultats pourraient être transférables pour l'immunothérapie du carcinome hépatocellulaire. Ainsi, une étude rétrospective sur 163 patients atteints de CHC réséqués chirurgicalement démontre qu'une forte infiltration intra-tumorale par des lymphocytes est un facteur de bon pronostic puisque ces patients présentent la meilleure survie sans récurrence (Wada et al., 1998). D'autre part, bien que rares, des cas de régression spontanée ont été décrits chez des patients atteints de CHC. Ces régressions peuvent survenir soit de façon systémique avec disparition de tous les foyers tumoraux et des métastases (Ayres et al., 1990), soit de façon plus spécifique avec disparition uniquement du CHC sans régression du carcinome gastrique associé (Ayres et al., 1990). La description de cas de régression spontanée suite à la rupture de la capsule hépatique et à la dissémination des antigènes tumoraux spécifiques dans la cavité péritonéale (Blondon et al., 2004; Randolph et al., 2008; Terasaki et al., 2000) ou suite à une biopsie chirurgicale ou à l'aiguille (Takeda et al., 2000) laisse supposer la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale de ces patients.

Plusieurs raisons font du CHC une bonne cible pour des essais d'immunothérapie active (Zerbini et al., 2006a). Premièrement, le système immunitaire des patients atteints de CHC ne va pas être affecté par une chimiothérapie concomitante puisque ce traitement se révèle inefficace pour ce type de tumeur. Deuxièmement, la progression de la pathologie semble suffisamment lente pour permettre de primer et de booster une réponse immunitaire cellulaire cliniquement efficace. Troisièmement, le foie est un organe fortement vascularisé et donc facilement accessible et infiltrable par les cellules immunitaires effectrices. Enfin, le CHC restant en général relativement confiné dans le foie, la progression tumorale peut être facilement quantifiée au long du traitement par des techniques d'imagerie.

Les traitements conventionnels actuels du CHC, comme la résection chirurgicale ou le traitement par radiofréquence, ont une action locale et sont donc inefficaces sur le traitement des micronodules ou des métastases non détectables par les outils classiques de diagnostic.

L'immunothérapie, de par son caractère systémique, pourrait ainsi être une approche particulièrement intéressante en appui des traitements curatifs actuels. De plus, comme il a été décrit précédemment, les traitements actuels du CHC bien qu'augmentant la survie des patients s'accompagnent de récurrences qui surviennent dans près de 70% des cas traités à 5 ans. De ce fait, l'immunothérapie pourrait constituer une stratégie de thérapie préventive contre la récurrence de la pathologie après un premier traitement. Enfin, la complication des cas de cirrhose en CHC dans près de 90% des cas pourrait permettre d'évaluer l'immunothérapie comme thérapie préventive de la survenue du CHC chez les patients à haut risque.

## 2. Les antigènes tumoraux du CHC

### a) *Antigènes de type oncotesticulaires*

De nombreux TAA ont été identifiés pour le CHC parmi lesquels des antigènes appartenant à la famille des antigènes des cellules germinales (cancer testis). Ces derniers sont particulièrement intéressants pour des approches d'immunothérapie puisqu'ils sont exprimés dans de nombreuses tumeurs et silencieux dans les cellules saines, hormis dans les cellules germinales qui sont dépourvues de molécules CMH-I et donc ne les présentent pas non plus aux CTL. Les antigènes associés au mélanome de la famille MAGE, et en particulier les antigènes MAGE-1 et MAGE-3, sont exprimés dans 46 à 80% des tissus réséqués de CHC et jamais retrouvés dans le foie non tumoral (Kobayashi et al., 2000; Luo et al., 2002; Mou et al., 2002). Des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de MAGE-1 et MAGE-3 ainsi que de deux autres antigènes de type « cancer testis », MAGE-10 et SSX-2, ont été détectées au sein de la tumeur et dans le sang périphérique de patients atteints de CHC (Bricard et al., 2005; Zerbini et al., 2004). Des réponses T spécifiques de ce type ont déjà été mises en évidence dans le mélanome et ont permis la mise en place de stratégies anti-tumorales prometteuses (Reynolds et al., 2003) qui pourraient également être intéressantes dans le cadre du traitement du cancer du foie. L'antigène NY-ESO-1 est également retrouvé dans 13 à 51% des CHC (Greten et al., 2006) et son expression a récemment été corrélée à un stade tumoral précoce du CHC (Peng et al., 2005). De plus, chez plus de 50% des patients avec des tumeurs exprimant NY-ESO-1, des réponses anticorps et cellulaire, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, spécifiques de cet antigène sont détectées (Korany et al., 2004).

### *b) Antigènes oncofoetaux*

Bien qu'une expression d'AFP au cours de la vie fœtale puisse conduire à une tolérance, des réponses contre cette protéine peuvent être générées lorsque celle-ci est présentée de façon optimale au système immunitaire.

L'alpha-foetoprotéine est la protéine sérique la plus abondante au cours du développement fœtal (Ruoslahti and Seppala, 1979). Elle est produite en grande quantité par l'endoderme du sac vitellin et par le foie fœtal avec des niveaux plasmatiques pouvant atteindre 3 mg/mL entre la 10<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> semaine du développement (Butterfield, 2004). La transcription de l'AFP est rapidement réprimée après la naissance (taux plasmatique entre 30 et 100 µg/mL) et la protéine est alors remplacée par l'albumine sérique. Chez l'adulte, la protéine est retrouvée à des niveaux extrêmement bas mais détectables dans le foie, de l'ordre de 1 à 3 ng/mL et chez la souris adulte, ce niveau est 5 à 50 fois plus élevé (Pihko and Ruoslahti, 1973). Dans 50 à 80% des cas de CHC, l'AFP est ré-exprimée jusqu'à des taux sériques de 1 mg/mL et sa détection dans le sérum a joué un rôle important pour le diagnostic de la pathologie et le suivi de la réponse à un traitement (Johnson, 2001). Une étude sur 306 cas déclarés de CHC montre que 50% des patients présentaient des taux très élevés d'AFP (> 400 ng/mL) au moment du diagnostic, 25% des taux modérément élevés (20-399 ng/mL), 25% des taux normaux (< 20 ng/mL) et que globalement, les patients avec de forts taux d'AFP avaient des tumeurs plus volumineuses, plus diffuses et une thrombose de la veine porte (Tangkijvanich et al., 2000). Avec une valeur seuil de 25 ng/mL, ce marqueur biologique a une sensibilité de 69%, une spécificité de 87% et une valeur prédictive positive de 70% pour le CHC (Durazo et al., 2008). Des pathologies hépatiques autres que le CHC peuvent être associées à des niveaux anormalement élevés d'AFP sérique comme par exemple, la cirrhose (détection dans 26% des cas) (Collazos et al., 1992), l'infection chronique par le VHC (10 à 43% des cas) (Bayati et al., 1998; Hu et al., 2004) et l'infection chronique par le VHB (15 à 51% des cas) (Chen and Sung, 1979; Harada et al., 1980). Les fonctions et les mécanismes d'action de l'AFP ne sont pas clairement élucidés. La protéine a notamment été impliquée dans les processus de différenciation cellulaire, de régulation de croissance et dans la carcinogenèse. Son action sur la croissance des cellules tumorales en culture est controversée. En effet, elle semble aussi bien favoriser la croissance (Li et al., 2002a; Li et al., 2002b; Wang and Xu, 1998) que l'inhiber (Dudich et al., 1999; Mizejewski and MacColl, 2003). De la même manière, des rôles immuno-régulateurs, aussi bien positifs que négatifs, ont été rapportés pour cette protéine (Evdokimova and Butterfield, 2008).

L'équipe du Dr Butterfield a montré que l'AFP, bien que sécrétée, pouvait être présentée en tant qu'antigène par des DC murines et humaines et que des clones lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> capables de reconnaître l'AFP dans un contexte CMH-I étaient maintenus dans le répertoire T murin et humain (Butterfield et al., 1999; Butterfield et al., 2001; Butterfield et al., 2003). Quatre épitopes immunodominants de l'AFP humaine, naturellement présentés dans un contexte HLA-A\*0201 et reconnus par le répertoire T humain de donneurs sains et de donneurs atteints de CHC, ont été décrits (Butterfield et al., 2001). Dans un modèle expérimental murin de CHC, un rôle d'antigène de rejet tumoral a été décrit pour l'AFP (Vollmer et al., 1999). La fréquence de lymphocytes T spécifiques de l'AFP présents dans le sang de patients atteints de CHC pourrait être corrélée avec le stade et la sévérité de la pathologie (Butterfield et al., 2003; Hanke et al., 2002b; Mizukoshi et al., 2006a; Ritter et al., 2004). Moins de données sont disponibles sur la réponse immunitaire spontanée CD4<sup>+</sup> envers l'AFP chez des donneurs sains ou atteints de CHC. Un épitope de l'AFP pour la présentation CD4<sup>+</sup> a récemment été trouvé chez les patients atteints de CHC (Alisa et al., 2005). Les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'AFP ne sont pas détectées chez les patients sains ou atteints d'une maladie chronique du foie, ce qui suggère une expansion *in vivo* de ces cellules en réponse à la tumeur (Alisa et al., 2005; Behboudi et al., 2010). L'ensemble de ces informations sont prometteuses puisqu'elles suggèrent qu'il est possible de surmonter la tolérance à une protéine du soi comme l'AFP.

Le glypican-3 (GPC3) est également un antigène oncofoetal exprimé pendant le développement embryonnaire dans le foie et le placenta et dont l'expression est inhibée à la naissance dans la majorité des tissus à l'exception des ovaires, des glandes mammaires, des poumons et des reins où de faibles niveaux de GPC3 sont détectables (Filmus, 2001). Son profil d'expression change au cours de la carcinogenèse avec une sous-régulation dans plusieurs types de lignées tumorales comme dans les ovaires (Lin et al., 1999) ou le sein (Xiang et al., 2001) et une surexpression dans le CHC et le mélanome (Nakatsura et al., 2003). Le GPC3 est détecté dans 84% des patients CHC testés (Hippo et al., 2004) mais son expression n'est pas surélevée chez les patients atteints d'hépatites virales ou de cirrhose (Yamauchi et al., 2005). Ainsi sa grande spécificité fait du GPC3 une cible d'immunothérapie particulièrement intéressante. Une étude récente a permis d'identifier des épitopes de GPC3 humain immunogéniques *in vitro* pour des CTL de patients sains comme atteints de CHC

(Komori et al., 2006). Le transfert adoptif de ces cellules T spécifique du GPC3 permet de limiter la croissance d'une xéno greffe de cellules cancéreuses de CHC dans des souris SCID.

### *c) Antigènes oncoviraux*

Les antigènes des virus de l'hépatite B et C ont été par le passé considérés comme des cibles potentielles pour l'immunothérapie du CHC. Cependant, jusqu'à présent, des protéines virales modifiées spécifiquement exprimées dans le tissu tumoral infecté et absentes dans le tissu infecté non tumoral adjacent n'ont pas été identifiées.

### *d) Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs*

Comme pour le traitement d'autres tumeurs, des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs ont été impliqués dans la pathogenèse du CHC et ces molécules ont été proposées comme cibles potentielles pour des protocoles d'immunothérapie.

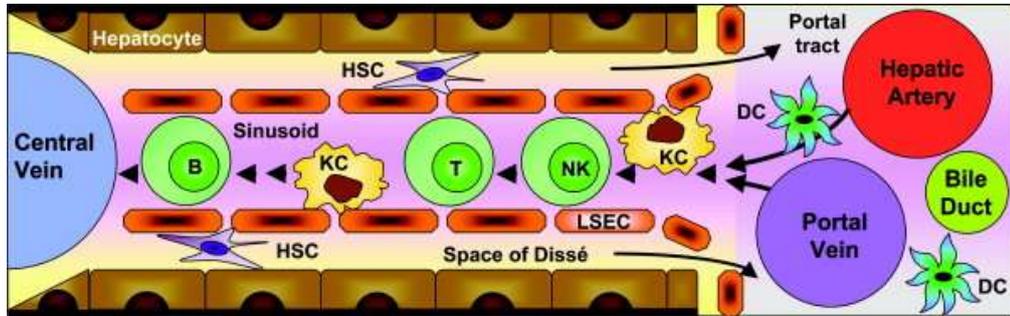
### *e) Antigènes surexprimés*

La sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) est exprimée dans plus de 85% des cancers humains et constitue de ce fait, un antigène tumoral attractif pour de nombreuses pathologies tumorales (Vonderheide et al., 1999). Cette protéine est également surexprimée au cours de l'hépatocarcinogenèse (Miura et al., 1997) et est retrouvée dans 80 à 90% des cas de CHC (Liu et al., 2004). Elle a été proposée comme nouvelle cible pour des approches d'immunothérapie du fait de sa surexpression et de la possibilité de la détecter dans le sérum des patients (Miura et al., 2005; Mizukoshi et al., 2006b).

## **3. Présentation antigénique du foie**

Le foie contient 10 à 15% du volume sanguin total dont plus de la moitié se trouve dans les sinusoides. Le sang et les cellules sanguines sont en contact avec la plupart des cellules constitutives du foie : hépatocytes, cholangiocytes, cellules de Kupffer, cellules stellaires, cellules endothéliales, cellules dendritiques et NK du foie (**figure 28**). Le répertoire

de cellules lymphocytaires associées au foie est différent, chez l'homme comme chez la souris, du répertoire de lymphocytes du sang périphérique ce qui suggère un rôle particulier de l'organe dans le système immunitaire (Doherty et al., 1999). Il a récemment été décrit des fonctions de cellules présentatrices pour divers types cellulaires spécifiques du foie.



**Figure 28 : Cellules immunitaires présentes dans un foie sain.** Les sinusoides du foie sont bordés par une monocouche de cellules endothéliales sinusoidales fenestrées (LSEC). Chaque lymphocyte passant au travers des sinusoides est en étroit contact avec les LSEC du fait du faible diamètre des sinusoides hépatiques (entre 6 et 15  $\mu\text{M}$ ) et du diamètre comparable des lymphocytes (entre 7 et 12  $\mu\text{M}$ ). L'espace de Dissé contient les cellules stellaires (HSC : hepatic stellate cell) au sein d'une matrice extracellulaire lâche. B : lymphocyte B ; DC : cellule dendritique ; KC : cellule de Kupffer ; NK : cellule natural killer ; T : lymphocyte T. (Racanelli and Rehmann, 2006).

Les hépatocytes, qui constituent les 2/3 de la population cellulaire du foie, n'expriment pas de molécules CMH-II chez l'adulte sain mais une expression aberrante a été établie dans des cas cliniques d'hépatite suggérant un rôle de CPA pour les hépatocytes (Dienes et al., 1987; Herkel et al., 2003; Ting and Trowsdale, 2002). Alors que les molécules CMH-I sont abondamment exprimées dans les hépatocytes, les constituants de la voie de présentation des peptides sur les CMH-I sont réduits limitant ainsi la présentation antigénique de type CMH-I dans les hépatocytes adultes (Chen et al., 2005a).

Les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) expriment des molécules favorisant la prise en charge (récepteur au mannose et récepteur scavenger) et la présentation (CMH-I, CMH-II, CD40, CD80, CD86) des antigènes (Knolle et al., 1999; Lohse et al., 1996). Les mécanismes d'endocytose, de phagocytose, de traitement et de présentation des antigènes sont réalisés par les LSEC avec une efficacité similaire à celle des DC (Steffan et al., 1986).

Les cellules de Kupffer sont des macrophages spécifiques du foie qui constituent environ 20% des cellules non-parenchymales hépatiques. Elles jouent un rôle important dans le système phagocytaire du foie et résident dans les sinusoides principalement au niveau de la zone périportale. Elles sont ainsi idéalement situées pour phagocyter les débris et les micro-

organismes présents dans le sang. Elles expriment toutes les molécules nécessaires au clivage protéique et à la présentation antigénique et peuvent stimuler les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Lohse et al., 1996; Maemura et al., 2005). Les cellules de Kupffer activées de façon spécifique après contact avec un antigène ou aspécifique après un contact avec les ROS présentent un phénotype de CPA (Maemura et al., 2005; Matsuno et al., 2002). Une fois activées, elles deviennent capables de recruter des DC et des précurseurs de DC et de stimuler leurs fonctions tumoricides, sécrétrices et phagocytaires (Douglas and Musson, 1986; Matsuno et al., 2002).

Les cellules stellaires hépatiques, aussi appelées cellules de Ito, sont des péricytes peu différenciés localisés entre les sinusoides et les hépatocytes. Elles jouent un rôle dans l'inflammation hépatique ainsi que dans la prise en charge et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elles induisent également la prolifération des cellules T de façon dépendante du CMH-II (Vinas et al., 2003).

Les cellules Pit sont des cellules NK résidant dans les sinusoides et représentant 43% de la population lymphocytaire dans le foie humain. Elles sont en contact avec les cellules de Kupffer et leurs pseudopodes leur permettent de passer au travers des fenestrations de la couche de cellules endothéliales sinusoides pour atteindre les microvillosités hépatiques (Luo et al., 2000). Leurs précurseurs sont des cellules NK de la moëlle osseuse qui migrent dans les sinusoides hépatiques où ils se différencient en cellules Pit ou en cellules LAK (lymphokine-activated killer) naturellement activées (Vermijlen et al., 2002). La cytotoxicité de ces cellules est 4 à 8 fois supérieure à celle des cellules NK du sang (Bouwens and Wisse, 1992). Les cellules Pit, comme les cellules NK, vont lyser préférentiellement les cellules dépourvues de molécules CMH-I et sont aussi capables de tuer des hépatocytes infectés par des virus (Luo et al., 2000; Sokol, 2002).

Les lymphocytes sont dispersés dans le parenchyme hépatique. Le foie humain contient environ 10<sup>10</sup> lymphocytes dont des constituants lymphocytaires de la réponse innée (cellules NK et NKT) et de la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Les cellules T conventionnelles, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, reconnaissent les antigènes respectivement dans des contextes CMH-II et CMH-I. Dans le foie, le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> surpasse celui de cellules T CD4<sup>+</sup> et le ratio cellules effectrices/cellules mémoires est plus élevé que dans le sang périphérique (Racanelli and Rehermann, 2006).

#### 4. Obstacles à l'immunothérapie du CHC

Malgré la capacité du système immunitaire à réagir contre les cellules cancéreuses, la présence de tumeurs indique que le développement tumoral peut échapper au contrôle du système immunitaire de l'hôte. Les mécanismes généraux d'échappement ont été présentés dans la partie IC1b3 et ceux intervenant dans le cas du CHC sont présentés ici.

Les tumeurs hépatiques utilisent deux principales stratégies pour échapper au système immunitaire : l'attaque et la défense (**tableau 8**). La première vise la destruction des cellules immunitaires et donc l'inhibition de leur action anti-tumorale. La deuxième correspond à la protection des cellules tumorales en rendant celles-ci invisibles pour le système immunitaire.

Attaque		Défense	
Système	Mécanisme	Système	Mécanisme
FAS/FASL	Apoptose des cellules T	Tregs	Immunosuppression
TRAIL/TRAILR	Apoptose des cellules T	CMH-I	Présentation de l'antigène
PD-1/PD-1L	Apoptose des cellules T	B7-1/B7-2	Présentation de l'antigène
Galectine-I	Apoptose des cellules T	IDO	Immunosuppression

**Tableau 8 : Mécanismes d'échappement des tumeurs hépatiques.** FAS : CD95 ; FASL : CD95L ; TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; PD-1 : programmed death-1 ; PD-1L: programmed death-1 ligand; Tregs: cellules T régulatrices; IDO: Indoléamine 2,3 dioxygénase. (Matar et al., 2009).

L'interaction entre le ligand FAS ou son isoforme sécrétée (sFASL) produite par les cellules tumorales avec le récepteur spécifique FAS exprimé à la surface des cellules lymphocytaires T a été impliquée dans l'évasion tumorale au système immunitaire (Song et al., 2001). Des études *in vitro* montrent que d'une part, l'AFP, surexprimée dans de nombreux CHC, favorise l'expression de FASL et de TRAIL et inhibe celle de FAS dans des cellules d'hépatome tout en d'autre part, favorisant l'expression de FAS et du récepteur de TRAIL (TRAILR) dans les lymphocytes (Li et al., 2005a; Li et al., 2005b). En altérant ainsi l'expression de TRAIL/TRAILR et de FAS/FASL, l'AFP permettrait aux tumeurs hépatiques d'échapper au contrôle du système immunitaire.

Une autre stratégie d'attaque implique l'interaction entre PD-1 (programmed death-1) et ses ligands comme PD-L1, PD-L2 et B7-H1. Le récepteur PD-1 est exprimé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dans les cellules NK, dans les cellules B et dans les monocytes après leur activation (Keir et al., 2007). Il a été montré que par comparaison avec une zone adjacente non tumorale, les cellules de Kupffer, macrophages spécifiques du foie, présentes dans la tumeur surexprimaient le ligand B7-H1 tandis que les cellules T CD8<sup>+</sup> infiltrantes

surexprimaient le récepteur PD-1 (Wu et al., 2009). Leur co-localisation dans le stroma des CHC conduit à une inhibition de la capacité proliférative et de la fonction effectrice des cellules T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>. Les sections tumorales sont de plus enrichies en cellules hépatiques exprimant le ligand PD-L1 (Shi et al., 2010). *In vitro*, les cellules T CD8<sup>+</sup> induisent l'expression de PD-L1 dans les hépatomes de façon dépendante de l'IFN- $\gamma$  ce qui en retour induit l'apoptose des lymphocytes (Shi et al., 2010). Un niveau élevé d'expression de PD-L1 dans les CHC est associé à un caractère agressif de la pathologie et à des risques élevés de récurrence après une chirurgie (Gao et al., 2009).

Un autre mécanisme possible impliquerait la galectine-1 notamment en jeu dans le mécanisme d'échappement tumoral via l'inhibition de l'activation et l'induction de l'apoptose des cellules effectrices T (Rubinstein et al., 2004). Cette protéine est exprimée dans un certain nombre de lignées hépatiques tumorales (Kondoh et al., 2003).

Parmi les mécanismes de défense, on peut citer le cas de facteurs émis par le CHC qui favoriseraient l'expansion des cellules T régulatrices tout en activant leur capacité suppressive (Cao et al., 2007). L'infiltration de ces cellules dans les CHC est un facteur de mauvais pronostic (Kobayashi et al., 2007). D'autre part, une sous-expression des molécules CMH-I, des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 (Fujiwara et al., 2004) et des molécules de transport des antigènes TAP-1 et TAP-2 (Matsui et al., 2002) est observée dans les lignées de cellules cancéreuses hépatiques humaines. De plus, les cellules de CHC peuvent échapper à l'apoptose induite par les CTL en surexprimant Bcl-2 et en sous-exprimant Bcl-xs (Chiu et al., 2003) et/ou en augmentant le niveau de survivine, membre important de la famille des inhibiteurs d'apoptose (Fields et al., 2004; Kannangai et al., 2005). D'autre part, bien que l'effet de l'AFP sur le système immunitaire soit controversé, il a été montré que l'AFP limitait l'expression des molécules CMH-II des cellules immunitaires (Peck et al., 1982; Um et al., 2004). Les DC et les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être fonctionnellement inhibées par l'AFP via une diminution de leur viabilité, une inhibition de leur capacité activatrice, une limitation de leur production de cytokines et une plus grande susceptibilité à l'apoptose (Um et al., 2004).

D'autre part, la présence d'une infection chronique par le VHB ou le VHC peut compliquer le succès d'une approche par immunothérapie puisque les virus peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte contre la tumeur (Liu et al., 2009; Nattermann et al., 2006). Ainsi, les patients atteints de CHC et avec une infection concomitante par le VHB ou le VHC pourraient être plus difficiles à traiter par immunothérapie. Par exemple, l'indoléamine 2,3

dioxygénase qui catalyse la dégradation du tryptophane et synthétise des métabolites immunosuppresseurs (Munn, 2006), est un médiateur important de la tolérance immunitaire périphérique dans le cas des infections chroniques par le VHC (Larrea et al., 2007). En effet, l'induction de l'expression d'IDO réduirait la réactivité des cellules T envers les antigènes viraux du VHC et influencerait négativement la réponse immunitaire des patients atteints de CHC et chroniquement infectés par le VHC.

## 5. Modèles d'études du CHC

Les approches d'immunothérapie sont des thérapies systémiques qui visent à exploiter le système immunitaire dans son ensemble. Un modèle expérimental avec des structures lymphoïdes primaires et secondaires intactes va permettre d'obtenir des informations essentielles sur l'induction et la régulation de la réponse immunitaire induite par l'immunothérapie ainsi que sur les éventuelles réponses auto-immunes lors du ciblage d'un antigène du soi (Butterfield, 2004). Cependant, les extrapolations à l'homme des résultats d'immunothérapie obtenus dans des modèles de CHC murins doivent être faites avec précaution. En effet, il existe des différences clés entre les systèmes immunitaires murins et humains. Par exemple, les leucocytes humains sont constitués d'environ 60% de neutrophiles et 40% de lymphocytes tandis que la proportion dans les leucocytes murins est plutôt de 15% de neutrophiles et 80% de lymphocytes. En dépit des différences existantes, les études pré-cliniques sur le modèle murin fournissent des informations importantes qui sont souvent confirmées dans les essais cliniques humains.

Le rôle étiologique d'agents externes dans le développement du CHC humain a été établi au cours d'études épidémiologiques. C'est notamment le cas des aflatoxines, de l'éthanol et des contraceptifs oraux (Wogan, 2000). Certains de ces composants sont carcinogènes également pour le foie murin, même si ce n'est pas le cas de tous les carcinogènes hépatiques humains. Les modèles murins de CHC chimiquement induits sont largement utilisés pour la recherche pré-clinique. L'agent carcinogène le plus utilisé chez la souris est la diéthylnitrosamine (DEN) qui est un carcinogène génotoxique. La DEN est classiquement administrée à la souris entre 12 et 15 jours d'âge par une unique injection intrapéritonéale (5 µg/g). Ce protocole a été largement étudié par le groupe de Vesselinovitch et permet d'obtenir, 44 semaines après l'injection intrapéritonéale de la DEN, un développement de CHC pour la totalité des souris mâles F1 injectées issues d'un croisement

entre les souches C57Bl/6J et C3H/HeN (Vesselinovitch, 1980; Vesselinovitch and Mihailovich, 1983; Vesselinovitch et al., 1984).

Les modèles tumoraux de CHC implantés sont ceux les plus utilisés du fait de leur facilité d'utilisation et de mise en place pour l'évaluation pré-clinique d'agents anti-cancéreux. Des lignées tumorales de CHC ou des fragments de tissus tumoraux peuvent être introduits 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 xéngreffes de cellules ou de fragments tumoraux de CHC humains dans des souris immunodéficientes nude ou SCID (severe combined immunodeficient). Ces implantations peuvent être ectopiques, en général en sous-cutané, ou orthotopiques. Les xéngreffes de CHC humains sous-cutanées sont souvent utilisées du fait de leur prise et de leur développement rapide, de la facilité d'utilisation du modèle et de la possibilité d'évaluer de façon non-invasive l'effet thérapeutique du protocole testé. Cependant, plusieurs groupes de recherche ont soulevé l'importance que peut avoir le microenvironnement sur le comportement biologique des cellules malignes. Par exemple, de nombreuses lignées tumorales ne métastasent pas quand elles sont implantées en sous-cutané alors qu'elles doivent le faire quand elles sont implantées orthotopiquement. Ainsi, l'interaction avec des facteurs spécifiques du foie doit être importante pour le développement du CHC (Jonkers and Berns, 2002; Killion et al., 1998). De ce fait, les résultats thérapeutiques obtenus dans des modèles ectopiques doivent être confirmés dans des modèles orthotopiques. Cependant, comme tout modèle, le modèle orthotopique présente des inconvénients que sont le geste chirurgical pour l'implantation et l'impossibilité de déterminer facilement la croissance tumorale et la réponse thérapeutique.

Finalement, bien que les modèles de xéngreffes ectopiques ou orthotopiques soient largement utilisés pour les évaluations pré-cliniques, il a souvent été montré que ceux-ci n'avaient qu'une faible valeur prédictive sur l'effet anti-tumoral observé chez les patients. Une des raisons explicatives peut être que les cellules tumorales injectées sont cultivées pendant des périodes prolongées avant l'implantation et du fait de la pression de sélection en culture, les cellules pourraient perdre certaines de leurs caractéristiques (Leenders et al., 2008). Des modèles de souris transgéniques ont également été mis au point. On peut notamment citer un modèle de souris transgéniques dans lequel la  $\beta$ -galactosidase est considérée comme un antigène du soi dont le profil d'expression suit celui de l'AFP et qui peut être utilisé comme modèle pour des études d'immunothérapie (Cany et al., 2007).

## 6. Essais pré-cliniques et cliniques basés sur l'AFP

Les essais pré-cliniques et cliniques présentés visent à exploiter les propriétés antigéniques des cellules tumorales.

### a) *Etudes pré-cliniques*

Le rationnel d'une immunothérapie du CHC dirigée contre l'alpha-foetoprotéine a été démontré dans de nombreux essais pré-cliniques basés sur l'utilisation de cellules dendritiques (**tableau 9**), de plasmides ADN (**tableau 10**), de vecteurs adénoviraux et de vecteurs peptidiques ou protéiques présentés et décrits succinctement dans cette partie.

En 1999, Vollmer et al. démontrent pour la première fois que la vaccination prophylactique de souris avec des vecteurs d'immunisation, DC murines transduites avec un adénovirus codant pour l'AFP murine (mAFP) ou un plasmide ADN exprimant l'AFP, permet un rejet de cellules tumorales AFP positives (Vollmer et al., 1999). La vaccination avec les deux types de vecteurs permet de générer chez les souris vaccinées une immunité AFP spécifique, évaluée par la présence d'une réponse CTL spécifique et par une protection *in vivo* contre l'établissement d'une tumeur murine AFP, bien que cette dernière soit obtenue de façon moins reproductible après la vaccination ADN qu'après la vaccination avec les DC transduites. Le même groupe établit que les clones lymphocytaires AFP spécifiques ne sont pas délétés dans les répertoires T murins et humains et un premier épitope de l'AFP humaine (AA542) restreint aux molécules de présentation humaines de classe I (HLA-A2.1) est décrit (Butterfield et al., 1999). En 2001, Tatsumi et al. montrent que des cellules dendritiques chargées avec des lysats cellulaires d'hépatocarcinomes et injectées à des souris avec de l'IL-12 permettent de limiter de façon très significative la progression tumorale de cellules greffées (Tatsumi et al., 2001). Plus récemment, il a été montré que des DC transduites avec la forme humaine de l'AFP et injectées à des souris induisaient une forte réponse CTL et une meilleure survie contre un challenge tumoral Hepa1-6 AFP<sup>+</sup> qu'une vaccination avec des DC exprimant la forme murine de l'antigène (Tan et al., 2006).

Stratégies	Antigène cible et adjuvants	Année Auteurs	Sujets d'étude	Résultats/Conclusion
DC murines transduites avec AdmAFP	mAFP	1999, Vollmer et al.	souris	Forte réponse T spécifique, 1ère démonstration de l'AFP utilisée comme Ag de rejet tumoral
DC murines et humaines transduites avec AdAFP-AA542	Peptide AFP humain AA542	1999, Butterfield et al.	PBMC humains HLA-A.0201, lignées humaines	Clones lymphocytaires T non délétés dans le répertoire humain et murin, Détection d'un épitope humain de l'AFP (AA542)
DC murines chargées avec lysats tumoraux + IL-12	lysats cellulaires de CHC murins + IL-12	2001, Tatsumi et al.	souris	Limitation de la progression tumorale et rejet tumoral en présence d'IL-12
DC murines transduites avec AdhAFP	hAFP	2006, Tan et al.	Souris	Forte activité lytique des CTL et allongement de la survie suite à un challenge Hepa1-6 AFP <sup>+</sup>

**Tableau 9 : Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant les cellules dendritiques.**

En 2000, Grimm et al. montrent qu'une immunisation basée sur l'administration de plasmide ADN mAFP engendre une réponse CTL (Grimm et al., 2000). Celle-ci est amplifiée et permet un retard de croissance de cellules tumorales AFP<sup>+</sup> et une prolongation de la survie lorsque le protocole de vaccination inclut une co-administration de cytokines (IL-12, IL-18 ou GM-CSF). Hanke et al. en vaccinant des souris avec un plasmide ADN codant pour la forme murine de l'AFP obtiennent une régression de tumeurs sous-cutanées AFP<sup>+</sup> mais ne détectent pas de réponse CTL spécifique lors de l'étude *in vitro* des splénocytes de souris vaccinées (Hanke et al., 2002a). Tian et al. montrent qu'une vaccination avec un plasmide ADN exprimant la forme native mAFP ou une forme fusionnée au domaine extracellulaire de CTLA-4 induit une forte réponse T et protège contre le développement de cellules de lymphomes exprimant l'AFP (Tian et al., 2004a; Tian et al., 2004b). Pour améliorer la réponse immunitaire induite par une vaccination ADN, de nombreuses équipes ont cherché à exprimer des adjuvants en plus de l'AFP comme la protéine HSP-70 (Wang et al., 2004b) ou la Salmonella Typhimurium (Chou et al., 2006) ou une combinaison de chimiokines et de cytokines (IP-10 et IL-12) (Rodriguez et al., 2008).

Stratégies	Antigène cible et adjuvants	Année Auteurs	Sujets d'étude	Résultats/Conclusion
Plasmide ADN exprimant mAFP + adjuvants	mAFP, IL-12, IL-18, GM-CSF	2000, Grimm et al.	Souris	Réponse CTL spécifique de l'AFP, Immunisation thérapeutique permet une régression partielle de tumeurs hépatiques Hepa1-6 AFP <sup>+</sup> et améliore la survie
Plasmide ADN exprimant une forme tronquée de mAFP	mAFP tronquée	2002, Hanke et al.	Souris	Rejet de tumeurs sous cutanées mais pas de détection de réponse CTL AFP-spécifique, Vaccination n'interfère pas avec la régénération hépatique
Plasmide ADN mAFP	mAFP	2004, Tian et al.	Souris	Réponse CTL, protège d'un challenge de lymphomes AFP <sup>+</sup>
Plasmide ADN exprimant mAFP fusionnée à CTLA4	mAFP + CTLA-4	2004, Tian et al.	Souris	forte réponse CTL spécifique de l'AFP, effet préventif sur le développement de cellules de lymphomes AFP <sup>+</sup> supérieur à une vaccination avec forme native de l'AFP
Plasmide ADN codant mAFP et HSP70	mAFP + HSP70	2004, Wang et al.	Souris	réponse T spécifique, protège d'un challenge tumoral avec des cellules de myélome murin AFP <sup>+</sup>
Vaccin ADN Salmonella T. + mAFP	Salmonella T. + mAFP	2006, Chou et al.	Souris	Réponse cytotoxique AFP spécifique, survie prolongée après challenge tumoral hépatique
Vaccin ADN mAFP + chimiokines et cytokines	mAFP + IP-10 + IL-12	2008, Rodriguez et al.	Souris avec CHC primaire	Combinaison vaccination ADN + injection intratumorale adjuvants permet régression tumorale

**Tableau 10 : Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant des plasmides ADN.**

Les approches basées sur des DC modifiées présentent des inconvénients de coût et de faisabilité pour une vaccination à plus grande échelle et les essais pré-cliniques basés sur une vaccination ADN se sont révélés moins efficaces que ceux basés sur les DC et nécessitent souvent l'administration d'adjuvants pour optimiser la réponse immunitaire induite. Des approches vaccinales avec des vecteurs adénoviraux seuls ou associés dans des protocoles de prime-boost pour potentialiser la réponse immunitaire induite par un priming ADN ont été mises en place (**tableau 11**).

Stratégies	Antigène cible et adjuvants	Année Auteurs	Sujets d'étude	Résultats/Conclusion
Adénovirus codant hAFP et IFN $\gamma$	hAFP + IFN $\gamma$	2008, Tan et al.	Souris	Réponse CTL, protection totale contre un challenge Hepa1-6 AFP <sup>+</sup>
Adénovirus réplicatif codant mAFP et non réplicatif p53	mAFP + p53 + chimiothérapie	2008, Sagawa et al.	lignées CHC humaines	Effet lytique sur des cellules humaines de CHC, augmenté en présence de 5-FU
Plasmide (mAFP/GM-CSF) prime-Adénov. (mAFP) boost	mAFP	2001, Meng et al.	Souris transgéniques	Génération d'une réponse T AFP-spécifique, Protège d'un challenge tumoral de cellules de lymphomes AFP <sup>+</sup>
Plasmide (mAFP) prime-Adénovirus (mAFP) boost	mAFP	2004, Saeki et al.	Souris	Limitation de la croissance de tumeurs hépatiques établies, Succès de la stratégie dépendante du niveau d'expression de l'AFP

**Tableau 11 : Etudes pré-cliniques utilisant l'AFP comme antigène de vaccination et basées sur des stratégies utilisant des vecteurs adénoviraux seuls ou associés dans des approches de prime-boost à des vecteurs ADN.**

Une xénoimmunisation de souris avec un adénovirus codant pour la forme humaine de l'AFP en présence d'IFN- $\gamma$  permet une protection totale contre un challenge tumoral avec des cellules Hepa1-6 (Tan and Zhu, 2008). En 2008, Sagawa et al. ont mis en évidence l'effet lytique sur une lignée humaine de CHC d'une combinaison vaccinale entre un adénovirus réplicatif codant l'AFP murine et un adénovirus non-réplicatif codant p53 (Sagawa et al., 2008). En 2001, Meng et al. utilisent un protocole dans lequel les souris sont primées avec une co-injection de plasmides codant pour mAFP et le GM-CSF et boostées avec un adénovirus exprimant mAFP (Meng et al., 2001). L'immunisation engendre une forte réponse T spécifique de l'AFP ainsi que la protection des souris vaccinées contre le développement de cellules de lymphomes exprimant l'AFP. Dans une étude similaire, l'efficacité de la vaccination est évaluée par l'injection de cellules murines d'hépatocarcinomes exprimant l'AFP et non des cellules de lymphomes (Saeki et al., 2004). Un retard de croissance significatif de la croissance tumorale est observé chez les souris vaccinées sans permettre un rejet complet de la tumeur.

Les essais pré-cliniques ont de plus permis de tester l'immunogénicité de protéines et de peptides (**tableau 12**).

Stratégies	Antigène cible et adjuvants	Année Auteurs	Sujets d'étude	Résultats/Conclusion
Protéines purifiées + adjuvant de Freund	rAFP	2008, Zhang et al.	Souris	Protection et réponse thérapeutique à des cellules Hepa1-6 AFP+
Vaccination peptidique	peptides hAFP générés par ordinateur	2001, Butterfield et al.	Cellules T humaines, souris transgéniques	Reconnaissance de peptides hAFP par les cellules T humaines, Identification de 4 peptides dominants de l'AFP humaine et de 10 peptides subdominants
Etudes <i>in vitro</i>	peptides dominants et subdominants d'hAFP	2006, Liu et al.	Donneurs humains, lignées humaines	Tous les épitopes testés activent des cellules T de haute avidité

**Tableau 12 : Etudes pré-cliniques basés sur la présentation protéique ou peptidique de l'AFP.**

Ainsi, en 2008, Zhang et al. obtiennent une réponse préventive et thérapeutique vis-à-vis de cellules Hepa1-6 lors d'une vaccination protéique avec l'AFP de rat chez des souris (Zhang et al., 2008). D'autre part, l'équipe de L.H. Butterfield a mis en évidence et évalué 4 épitopes immunodominants et 10 épitopes subdominants de l'AFP humaine présentés naturellement par les molécules CMH-I HLA-A2.1 (Butterfield et al., 2001; Liu et al., 2006). Une analyse clinique japonaise a, de la même manière, permis d'identifier 5 épitopes immunodominants de l'AFP humaine présentés dans un contexte CMH HLA-A2402 (Mizukoshi et al., 2006a).

Enfin, il a été montré que le traitement par radiofréquence thermique des patients porteurs de petits CHC permettait de déclencher une réponse de type immunitaire. En effet, la nécrose des cellules tumorales induite par la RFA génère de nombreux antigènes tumoraux qui peuvent être captés, traités et présentés par les CPA. De plus, la RFA a la propriété de moduler l'environnement immunologique du foie en mobilisant et en activant des cellules immunitaires. Ainsi, ce type de traitement pourrait favoriser une réponse immunitaire dirigée contre des antigènes tumoraux et induite par une approche d'immunothérapie active (Fagnoni et al., 2008). Zerbini et al. montrent que l'incubation *in vitro* de monocytes de patients atteints de CHC avec des débris tumoraux générés lors de leur traitement par RFA permet l'expression de molécules de co-stimulation et d'adhésion cellulaire et favorise la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines (Zerbini et al., 2008). Une réponse de type T spécifique du CHC peut de plus être générée par des cellules dendritiques activées et incubées avec les débris de tissus de CHC traités par RFA. Bien que la réponse T induite indirectement

par RFA soit insuffisante pour empêcher le développement du CHC, elle peut être une base pour une thérapie adjuvante des patients traités par RFA (Zerbini et al., 2006b).

### *b) Essais cliniques*

Une première étude pilote d'immunothérapie basée sur l'AFP a été menée aux USA en 2003 par le groupe de L.H. Butterfield (Butterfield et al., 2003). Le but de l'étude était d'évaluer la réponse immunitaire de patients atteints de CHC de stade avancé (stade IVa et IVb) à l'administration de 4 peptides immunodominants dans un contexte HLA-A-0201 (**tableau 13**).

<b>Dénomination</b>	<b>Séquence peptidique</b>
hAFP 137	PLFQVPEPV
hAFP 158	FMNKFIYEI
hAFP 325	GLSPNLNRFL
hAFP 542	GVALQTMKQ

**Tableau 13 : Dénomination et séquence peptidique des 4 peptides immunodominants de l'AFP humaine décrits pour le contexte HLA-A-0201.**

Six patients d'haplotype HLA-A-0201 ont été inclus dans l'étude. Deux injections intradermiques hebdomadaires des peptides administrés sous forme d'émulsion avec de l'adjuvant incomplet de Freund étaient pratiquées pendant trois semaines à la dose de 100 µg (3 patients) ou 500 µg (3 patients) de chaque peptide. Des PBMC des patients ont été récoltés avant et après le traitement pour l'analyse de la réponse immunitaire générée. Une étude par ELISPOT et une analyse par FACS après marquage avec des tétramères de classe CMH-I montrent que tous les patients génèrent une réponse T spécifique de la plupart ou de tous les peptides présentés lors de la vaccination et ce malgré la présence de taux élevé d'AFP circulante dans le sang des patients. Cet essai ne s'accompagne pas d'une réponse clinique, ni d'une diminution du taux d'AFP circulant. Cependant, cette étude démontre la bonne tolérance des patients au traitement ainsi que la possibilité du répertoire T humain à générer une réponse spécifique de l'AFP dans un contexte de présentation CMH-I.

Le même groupe a publié en 2006 les résultats d'une étude d'immunothérapie anti-*AFP* de phase I/II basée sur la vaccination par des cellules dendritiques autologues chargées avec les 4 peptides immunodominants précédemment cités (Butterfield et al., 2006). Sur les 16 patients inclus dans l'étude, 10 ont pu bénéficier du traitement complet. Ils étaient atteints de CHC avancés de stade III, IVa ou IVb d'étiologies variées et 9 d'entre eux avaient déjà bénéficié d'un traitement. Les patients ont reçu trois injections intradermiques de cellules

dendritiques autologues chargées avec chacun des 4 peptides à 2 semaines d'intervalle. Une escalade de dose a été testée avec une injection de  $1.10^6$ ,  $5.10^6$  et  $10^7$  cellules dendritiques par administration. Des lymphocytes du sang périphérique sont prélevés avant, pendant et après les immunisations et sont testés *ex vivo* dans des marquages par tétramère et analysés par ELISPOT. Bien que la maladie ait progressé pour 9 patients traités et bien qu'aucune réponse clinique objective n'ait été rapportée, l'analyse immunologique montre que 6 patients sur 10 ont développé une réponse T spécifique à au moins 1 des trois peptides pour lesquels une analyse par tétramère a été possible. De la même manière, une réponse significative chez 6 patients a été observée par ELISPOT IFN- $\gamma$  sans que celle-ci ne soit forcément retrouvée chez un patient ayant répondu pour l'analyse par tétramères. Une étude complémentaire publiée en 2007 cherche à analyser l'absence de corrélation entre la réponse T CD8<sup>+</sup> AFP spécifique détectée et une réponse clinique (Butterfield et al., 2007). Il semble que les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifique de l'AFP activées lors de la vaccination soient largement non fonctionnelles et que le protocole d'immunisation n'engendre pas de réponse T CD4<sup>+</sup>.

Deux essais d'immunothérapie basés sur l'AFP sont actuellement en phase de recrutement. Le premier est un essai clinique multicentrique de phase I/II (Essai NCT01128803) mené par le CHU de Nantes pour un protocole d'immunothérapie du CHC par induction d'une réponse anti-AFP. Une étude pilote menée par le même investigateur entre 2005 et 2006 sur des patients porteurs de l'haplotype HLA-A2 et atteints d'une cirrhose compliquée ou non d'un CHC a permis, en l'absence d'une stimulation spécifique, de détecter, chez certains d'entre eux, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques des peptides hAFP 137 et 158 (Pichard et al., 2008). L'essai en cours de recrutement prévoit le recrutement de 15 patients qui recevront trois injections de cellules dendritiques chargées avec les peptides de l'AFP humaine 137, 158 et 542. Le suivi de la réponse T sera fait grâce à des monomères CMH-peptides et par des analyses ELISPOT IFN- $\gamma$ . La fin de l'essai est prévue pour avril 2012.

Le deuxième essai clinique de phase I/II en cours de recrutement (Essai NCT00669136) et porté par l'université de Pittsburgh a pour objectif d'évaluer la sécurité, la toxicité et les effets immunologiques d'un protocole de prime-boost basé sur l'AFP. Le priming consiste en trois co-injections intra-musculaires d'un plasmide codant l'AFP humaine et d'un plasmide codant pour le GM-CSF humain suivi d'un unique boost intra-musculaire avec un adénovirus codant pour l'AFP humaine. Vingt-cinq patients devraient être inclus et la fin de l'étude est prévue pour décembre 2011.

## **E. Utilisation des MVA dans des protocoles d'immunothérapie du cancer**

Le virus de la vaccine appartient à la famille des *Poxviridae* qui regroupent des virus caractérisés par un long génome, une réplication dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent et une expression de leurs propres enzymes nécessaires à la réplication et à la transcription de l'ADN viral (Smith and Vanderplasschen, 1998). Le virus de la vaccine est le seul virus à avoir permis d'éradiquer totalement une maladie humaine, la variole en 1978. Comme décrit précédemment, des souches atténuées du virus de la vaccine ont été générées pour limiter les risques d'utilisation de ce vecteur chez l'homme. La souche Modified Virus Ankara (MVA) en est un exemple.

### **1. Caractéristiques et obtention des MVA**

#### *a) Origine de la souche MVA*

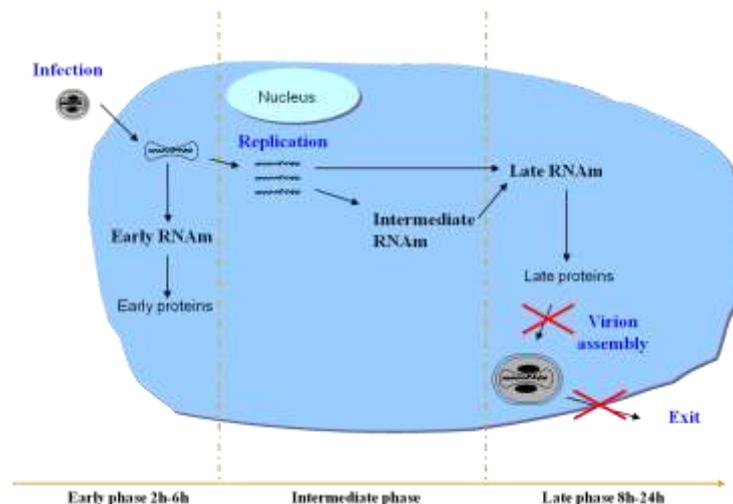
La souche MVA a été obtenue après 574 passages de la souche Ankara du virus de la vaccine sur des cellules embryonnaires de poulet. Ces passages successifs ont permis la génération d'un virus non-propagatif sur la plupart des cellules de Mammifères, non-virulent chez les animaux sains ou même immunodéprimés (Mayr et al., 1978) et qui a été utilisé sans effet indésirable apparent pour la vaccination de 120 000 personnes en Allemagne dans les années 1970 (Hochstein-Mintzel et al., 1975).

Au cours de l'atténuation de la souche Ankara en MVA, les altérations génétiques ont été analysées (Meyer et al., 1991). Six délétions majeures sont présentes dans la souche MVA atténuée par rapport à la souche Ankara native qui réduisent la taille du génome de 15% environ passant de 208 kilobases à 177 kilobases. Quatre délétions surviennent au cours des 382 premiers passages résultant en un virus atténué au phénotype similaire à celui du MVA. Durant les 190 passages suivants, les deux dernières délétions surviennent aboutissant à la souche MVA atténuée. Ces délétions concernent notamment des gènes viraux impliqués dans la modulation de l'immunité de l'hôte (Blanchard et al., 1998) et dans le spectre des hôtes potentiels (Altenburger et al., 1989; Meyer et al., 1991).



de la réplication de l'ADN. Les gènes intermédiaires codent pour des facteurs nécessaires pour la transcription des messagers tardifs et les gènes tardifs, exprimés lorsque les facteurs de transcription tardifs sont disponibles, codent pour des protéines de structure du virus, des enzymes virales et certains facteurs de virulence. L'assemblage des nouveaux virions commence par la formation de structures membranaires discrètes dans lesquelles sont empaquetés les ADN concatémériques. Une première étape de maturation permet la formation de particules intracellulaires matures enveloppées par des membranes modifiées du golgi et transportées à la périphérie de la cellule. La fusion de ces particules enveloppées avec la membrane cellulaire libère des particules extracellulaires matures.

Le génome du MVA a été séquencé et les gènes perdus lors des passages successifs ont été identifiés (Antoine et al., 1998). Une des propriétés du MVA ayant participé à son essor en tant que vecteur de vaccination pour l'homme est son incapacité à se répliquer dans les lignées cellulaires et les lignées primaires humaines (Drexler et al., 1998). L'arrêt du cycle viral du MVA a lieu tardivement dans les cellules de Mammifères au niveau de l'étape d'assemblage des virions (Zhang et al., 2007) (**figure 30**). Des expériences de PCR quantitative en temps réel et de titration virale confirment le fait que la souche MVA atténuée du virus de la vaccine est ainsi non-propagative dans la plupart des cellules de Mammifères (Zhang et al., 2007) (Meyer et al., 1991).



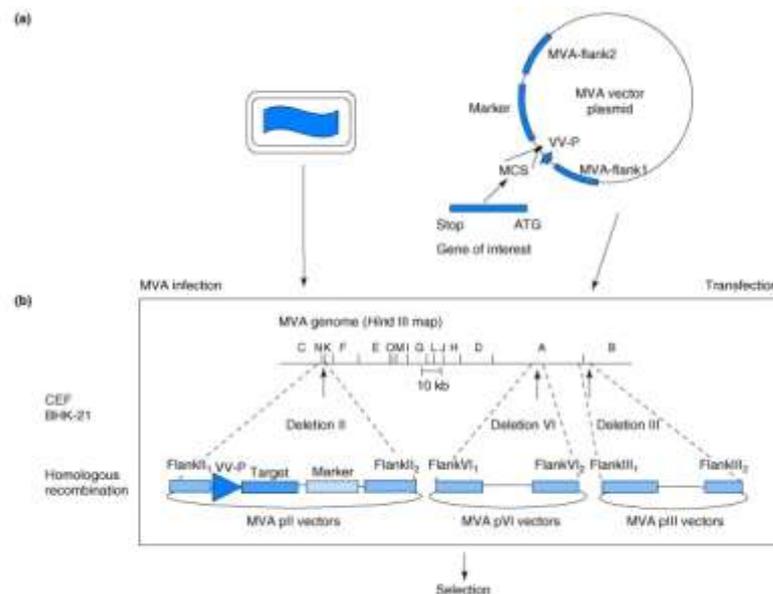
**Figure 30 : Cycle du virus atténué MVA.**

Ce blocage tardif du cycle a lieu sans altération de l'expression des gènes viraux précoces et tardifs ou du niveau d'expression de protéines exogènes, qui est dans les cellules en culture au moins aussi important que celui obtenu avec des souches virulentes du virus de la vaccine (Sutter and Moss, 1992). Cette donnée est très importante puisqu'elle assure la

synthèse des protéines virales sous le contrôle des promoteurs viraux précoces et tardifs et par conséquent permet d’envisager l’expression d’une protéine recombinante exogène (Sutter and Moss, 1992).

### c) *MVA recombinants*

La méthode la plus utilisée pour générer des MVA recombinants est la recombinaison homologue entre le génome viral et de l’ADN plasmidique (Mackett et al., 1984). Des cellules permissives, préalablement infectées avec le virus atténué parental, sont transfectées avec le plasmide de transfert contenant le gène recombinant sous le contrôle d’un promoteur de la vaccine et entouré de séquences flanquantes de plusieurs centaines de bases provenant du virus de la vaccine atténué (**figure 31**). Les sites de délétion naturels dans le génome MVA ou les loci codant pour les protéines virales de la thymidine kinase ou de l’hémagglutinine servent généralement de site d’insertion pour les transgènes.



**Figure 31 : Génération de MVA recombinants.** (a) Représentation schématique d’une particule virale MVA à gauche et d’un plasmide de transfert à droite. Des séquences flanquantes (MVA-flank1 et 2) adjacentes au site de délétion du MVA sont clonées dans le plasmide de transfert et les gènes d’intérêts sont insérés entre ces séquences et placés sous le contrôle d’un promoteur spécifique du virus de la vaccine (VV-P). Les MVA recombinants sont générés par infection de cellules embryonnaires de poulet (CEP) ou de cellules rénales de hamster (BHK-21) avec des particules virales MVA et par transfection avec le plasmide vecteur de transfert. Cela permet une recombinaison homologue entre les séquences virales flanquantes de la particule virale et du plasmide de transfert. (b) Schéma du génome MVA et des séquences plasmidiques désignées pour l’insertion d’ADN exogène dans une cellule infectée par le MVA et transfectée avec le plasmide vecteur. Les délétions génomiques II, III et IV de la souche MVA atténuée sont présentées en pointillés. (Drexler et al., 2004).

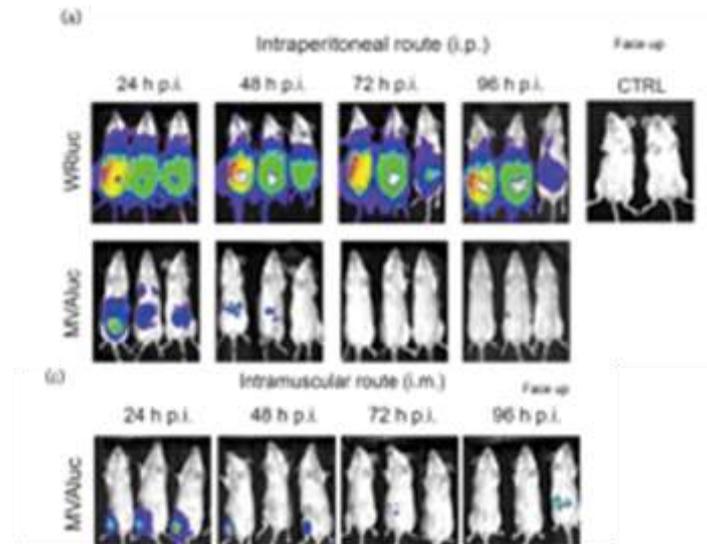
De nombreuses méthodes permettent ensuite l'isolement des virus recombinants comme par exemple la sélection basée sur le bromodésoxyuridine pour la délétion du gène de la thymidine kinase, la résistance à l'acide mycophénolique conférée par l'expression de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase, la détection d'un marqueur colorimétrique ( $\beta$ -galactosidase ou la  $\beta$ -glucuronidase) ou l'hybridation de l'ADN viral (Carroll, 2003). L'expression des gènes recombinants est sous le contrôle de promoteurs viraux précoces, intermédiaires, tardifs ou précoces-tardifs qui diffèrent par leur efficacité de transcription. Comme décrit précédemment, les promoteurs précoces expriment les gènes avant la réplication de l'ADN, les promoteurs intermédiaires et tardifs eux, après la réplication de l'ADN. De façon à obtenir une expression forte et précoce du gène d'intérêt, de nombreux vecteurs recombinants contiennent la séquence d'intérêt sous le contrôle de promoteurs précoces/tardifs naturels, modifiés ou synthétiques (Wyatt et al., 1996). La souche non-répliquative MVA a été approuvée par l'Institut National de la Santé américain (NIH) pour l'utilisation clinique de ces vecteurs recombinants.

## 2. Biodistribution, ciblage et mode d'action *in vivo*

Dès les années 1970, la souche atténuée MVA a été considérée comme sûre pour la vaccination contre le smallpox. Cependant, malgré l'utilisation du MVA dans de nombreux protocoles d'immunisation de modèles expérimentaux, celle-ci ne s'est accompagnée qu'assez récemment d'études sur ses effets *in vivo*, en particulier sur sa capacité à atteindre et à infecter des tissus cibles autres que le site d'inoculation du virus, sur sa période de persistance pour permettre l'expression des transgènes, sur son interaction avec les constituants du système immunitaire de l'hôte et sur les systèmes de défense immunologiques dirigés contre le vecteur.

Esteban et al. montrent que, sur le modèle murin, après une injection intrapéritonéale, les tissus infectés par le MVA (rate, foie et ovaires) sont les mêmes que ceux ciblés par le virus de la vaccine, ce qui indique que la souche atténuée MVA a conservé la capacité d'infecter les mêmes tissus que la souche virale native (Ramirez et al., 2000a). Ils démontrent de plus que, comparé à la souche native, le pic d'expression du transgène codé par le MVA a lieu plus tôt avec des niveaux dix fois plus élevés d'expression aux temps courts dans le foie et la rate et que cette expression est plus transitoire que celle obtenue avec le virus natif. En effet, le niveau d'expression du transgène chute rapidement 18 heures (rate et foie) à 24 heures (ovaires) après l'inoculation du MVA ce qui traduit le caractère non-propagatif du

virus. Des expériences d’imagerie par bioluminescence confirment le caractère transitoire de l’expression du transgène (**figure 32**) et démontrent que les injections intra-péritonéales et intra-musculaires sont les plus efficaces pour obtenir des forts niveaux d’expression des transgènes (Gomez et al., 2007).



**Figure 32 : Visualisation de la biodistribution de la souche native du virus de la vaccine (WRluc) et de la souche atténuée (MVA luc) par imagerie par bioluminescence après une injection intrapéritonéale (a) ou intramusculaire (b).** (Gomez et al., 2007).

La capacité du MVA à induire une réponse immunitaire contre un transgène dans de nombreux modèles a conduit à étudier, chez l’homme et chez la souris, l’interaction du MVA avec les cellules dendritiques, cellules présentatrices d’antigènes les plus efficaces pour l’induction d’une réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

Le MVA semble infecter plus efficacement les DC humaines immatures que les DC matures ce qui pourrait être attribué à l’importante activité phagocytaire des premières (Banchereau and Steinman, 1998). L’infection de DC humaines par le MVA ou l’incubation de DC humaines avec des cellules Hela infectées par le MVA entraînent l’activation partielle des cellules dendritiques caractérisée par une sur-expression de molécules de co-stimulation comme CD80, CD83 et CD86 et par une sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l’IL-6 (Drillien et al., 2004). L’activation par le MVA de DC immatures reste incomplète même en présence de cytokines de maturation et en dépit de la sur-expression initiale des molécules de co-stimulation (Kastenmuller et al., 2006). Cette activation partielle, également observée lors de l’infection de DC immatures par le virus de la

vaccin natif, a été interprétée comme un mécanisme spécifique d'échappement du virus au système immunitaire (Engelmayer et al., 1999; Jenne et al., 2000). L'activation des DC par le MVA ne requiert pas l'expression de gènes viraux suggérant que la liaison du virus ou son incorporation suffisent. L'activation est NF- $\kappa$ B dépendante (Drillien et al., 2004). Il a été montré que l'expression de gènes codés par le MVA suite à l'infection de DC humaines matures ou immatures était restreinte aux gènes viraux précoces ce qui suggère que la présentation directe des produits d'expression des gènes tardifs par les DC n'est pas possible. Des travaux récents montrent que, malgré le fait que le MVA soit tout à fait capable d'infecter les DC et ainsi d'exprimer efficacement les protéines virales et recombinantes dans ces cellules présentatrices, l'induction de la réponse immunitaire T cytotoxique par le MVA est fortement voire exclusivement basée sur la présentation croisée (Gasteiger et al., 2007). Ainsi, alors que l'expression de peptides ou de protéines rapidement dégradées conduit préférentiellement à leur présentation directe et que les antigènes stables sont des substrats efficaces pour la présentation croisée, cette dernière démonstration est particulièrement intéressante pour le design des vecteurs MVA. Dans le modèle murin, les cellules dendritiques sont les cellules préférentiellement infectées par le MVA parmi les composants cellulaires du système immunitaire (Liu et al., 2008). L'infection de DC murines par le MVA induit leur maturation phénotypique et une sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IFN- $\alpha$  après 18 heures d'infection. Douze heures après l'infection, l'apoptose survient massivement dans les cellules dendritiques infectées et les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées par des cellules dendritiques non infectées (Liu et al., 2008).

### **3. Essais d'immunothérapies pré-cliniques et cliniques basés sur l'utilisation du MVA**

#### ***a) Essais pré-cliniques***

L'équipe du Dr Ellenhorn développe un MVA recombinant exprimant p53 (rMVAp53) (Espenschied et al., 2003). Dans une cellule saine, le facteur de transcription p53 induit l'expression de nombreux gènes conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. Dans près de 50% des cancers humains, p53 est surexprimé sous une forme mutée qui ne permet plus d'assurer ses capacités anti-prolifératives et apoptotiques. p53 est ainsi une cible intéressante pour une approche d'immunothérapie. L'immunisation des souris avec rMVAp53 induit chez celles-ci une forte réponse T cytotoxique spécifique de p53 et les protège contre

un challenge tumoral de cellules de sarcome sur-exprimant p53 (Espenschied et al., 2003). L’utilisation de souris transgéniques exprimant la version humaine de p53 a permis de démontrer qu’une immunisation avec le MVA recombinant permettait de surmonter la tolérance à p53 dans le modèle murin et chez l’homme (Song et al., 2007).

Un MVA recombinant codant pour l’antigène carcino-embryonnaire (CEA) ainsi que trois molécules co-stimulatrices (B7-1, ICAM-1 et LFA-3 annoté TRICOM), MVA-CEA/TRICOM, induit de fortes réponses spécifiques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez des souris vaccinées (Hodge et al., 2003). Une réponse thérapeutique anti-tumorale est d’ailleurs obtenue lorsque ce MVA recombinant est utilisé comme premier vecteur de vaccination dans une approche de prime-boost hétérologue en association avec un fowlpox CEA/TRICOM (Hodge et al., 2003) (Hodge et al., 2009).

### *b) Essais cliniques*

Plusieurs MVA recombinants seuls ou associés à d’autres vecteurs dans des protocoles de prime-boost sont actuellement développés dans des essais cliniques (**tableau 14**).

<b>Vecteur</b>	<b>Indication</b>	<b>Phase</b>
MVA-tyrosinase	Mélanome, stade II	I
MVA-tyrosinase/cellules dendritiques	Mélanome, stade IV	I
MVA-Antigènes du mélanome (plasmide ADN prime-boost)	Mélanome, stades II, III, IV	I
MVA-Antigène spécifique de la prostate (PSA)-Phosphatase acide prostatique (PAP)	Cancer de la prostate non métastatique	I/II
MVA-HER-2	Cancer du sein	I/II
MVA-5T4	Cancer du rein métastatique	II
	Cancer colorectal	II
	Cancer de la prostate progressif	II
MVA-MUC1-IL2	Cancer du sein	II
	Cancer de la prostate	II
	Cancer du rein	II
	Cancer du poumon non à petites cellules	II, IIb

**Tableau 14 : MVA recombinants exprimant des antigènes associés aux tumeurs actuellement en essais cliniques.** (Acres and Bonnefoy, 2008).

Des MVA recombinants exprimant les antigènes associés aux tumeurs HER-2, PSA et PAP sont actuellement testés dans des essais de phase I/II aux Etats-Unis par la société Bavarian Nordic ([www.bavarian-nordic.com](http://www.bavarian-nordic.com)). Cette société a développé sa propre souche de

MVA, MVA-BN<sup>®</sup> (Timm et al., 2006). Le MVA-BN<sup>®</sup>PRO contient les séquences de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et de la phosphatase acide prostatique (PAP) et les études pré-cliniques ont démontré sa capacité à induire une réponse immunitaire à la fois contre PSA et contre PAP. Ce vecteur est actuellement testé en phase I/II sur 18 patients atteints d'un cancer de la prostate non métastatique et hormono-réfractaire (Essai NCT00629057). Une évaluation immunologique préliminaire révèle l'induction d'une réponse T spécifique pour les deux transgènes. La même société évalue en phase I/II l'utilisation du MVA-BN<sup>®</sup>HER2 codant pour le récepteur au facteur de croissance HER2-Neu sur-exprimé dans 20 à 30% des cas de cancers du sein. Ce vecteur va être évalué en traitement unique (Essai NCT01158469) et après un traitement par chimiothérapie (Essai NCT01152398).

Plusieurs études de phase I ont évalué des MVA recombinants exprimant la tyrosinase humaine, antigène de différenciation spécifique du mélanome. Alors que cette construction était prometteuse dans des expériences pré-cliniques (Drexler et al., 1999), elle n'a pas permis d'induire une réponse T spécifique (Meyer et al., 2005) ou un bénéfice clinique chez les patients traités et atteints de mélanome (Lindsey et al., 2006). Cet exemple illustre le fait que la capacité d'un vaccin poxviral anti-cancer à induire une réponse immunitaire efficace chez l'homme peut être dépendante du choix de l'antigène et de la population de patients testée. Cependant, un essai de phase I dans lequel les patients atteints de mélanome ont reçu par injection intraveineuse des cellules dendritiques autologues infectées *ex vivo* par le MVA codant la tyrosinase s'est révélé efficace pour l'induction d'une réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique (Di Nicola et al., 2004). Les approches par prime boost avec des antigènes du mélanome se sont révélées décevantes (Smith et al., 2005b).

La société Oxford BioMedica développe un MVA exprimant l'antigène oncofoetal 5T4 (Trovax<sup>®</sup>) retrouvé dans la plupart des cancers épithéliaux comme le cancer du colon, du sein ou du rein. Plus de 700 doses de ce vecteur ont été administrées à plus de 200 patients à ce jour (Amato, 2010). Trovax<sup>®</sup> a été évalué dans des essais de phase II pour le cancer colorectal métastatique seul ou en combinaison avec de la chimiothérapie ou de la chirurgie (Harrop et al., 2006c; Harrop et al., 2007). Des réponses immunitaires cellulaires et humorales ont été rapportées et la réponse anticorps a été corrélée avec une stabilisation de la maladie. Dans le traitement du cancer métastatique du rein, l'efficacité de Trovax<sup>®</sup> a été évaluée seule ou en association avec de l'IL-2 ou de l'IFN- $\alpha$  (Amato et al., 2008b; Amato et al., 2009). Dans les deux cas, une forte réponse immunitaire spécifique a été mise en évidence. Un essai

de phase III pour évaluer Trovax<sup>®</sup> en tant que premier traitement a montré une prolongation de la survie des patients mais n'a pas permis d'atteindre l'objectif principal de l'étude, la survie globale. Les essais de phase II pour le traitement du cancer de la prostate hormono-réfractaire ont montré l'induction d'une réponse immunitaire spécifique sans effet bénéfique supplémentaire lorsque le Trovax<sup>®</sup> est administré en combinaison avec du GM-CSF (Amato et al., 2008a).

La société Transgene évalue actuellement un MVA codant pour l'antigène MUC1 humain et l'interleukine 2 humaine (TG4010<sup>®</sup>) pour le traitement du cancer du poumon, de la prostate, du rein et du sein. Les quatre essais cliniques de phase II sont achevés (Acres, 2007). En monothérapie pour le traitement du cancer du sein métastatique comme en seconde ou troisième ligne de traitement pour les cancers métastatiques, une stabilisation de la maladie a été observée chez 31% des patients. Une réponse immunitaire spécifique contre MUC1 a été associée à une meilleure réponse immunitaire contre l'antigène PSA. En monothérapie ou en combinaison avec un traitement par cytokines, la meilleure réponse clinique obtenue a été une stabilisation de la maladie dans l'indication pour le cancer du rein. Pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules, une étude clinique de phase IIb a démontré l'immunogénicité du vecteur vaccinal et des signes d'efficacité clinique de la combinaison du traitement MVA avec de la chimiothérapie (Ramlau et al., 2008). Le démarrage d'une étude clinique de phase IIb/III mondiale est prévu pour la fin de l'année 2010.

Un MVA co-exprimant les antigènes E6 et E7 de HPV de type 16 ainsi que l'interleukine 2 humaine est également développé par Transgene. Les études cliniques de phase II ont montré une bonne tolérance et des réponses cliniques prometteuses chez les femmes atteintes de lésions CIN2/3 liées à HPV16. Un essai clinique de phase IIb contre placebo a été démarré par la société Roche avec une première patiente recrutée en septembre 2009. L'essai vise à inclure 200 patientes en Europe et aux Etats-Unis.

# Présentation du projet de thèse

## II. Présentation du projet de thèse

### A. Présentation et enjeux du projet

Les possibilités thérapeutiques pour le traitement du cancer du foie restent limitées : les cas chirurgicaux sont rares, le taux de récurrence après un traitement par résection est élevé, le traitement par chimiothérapie est décevant et la radiofréquence n'a qu'une action locale. La recherche de nouvelles approches est donc indispensable. Comme nous l'avons vu précédemment, l'immunothérapie du CHC basée sur l'alpha foetoprotéine offre des perspectives intéressantes en appui de traitements pour limiter les risques de récurrence. En effet, l'AFP a largement été décrite comme antigène spécifique du CHC et a déjà été testée en pré-clinique et en clinique. De plus, la présence de lymphocytes T mémoires spécifiques de l'AFP dans les répertoires murins et humains ainsi que l'utilisation convaincante chez la souris de l'AFP en tant qu'antigène de rejet tumoral sont autant d'arguments pour explorer l'efficacité d'une telle approche.

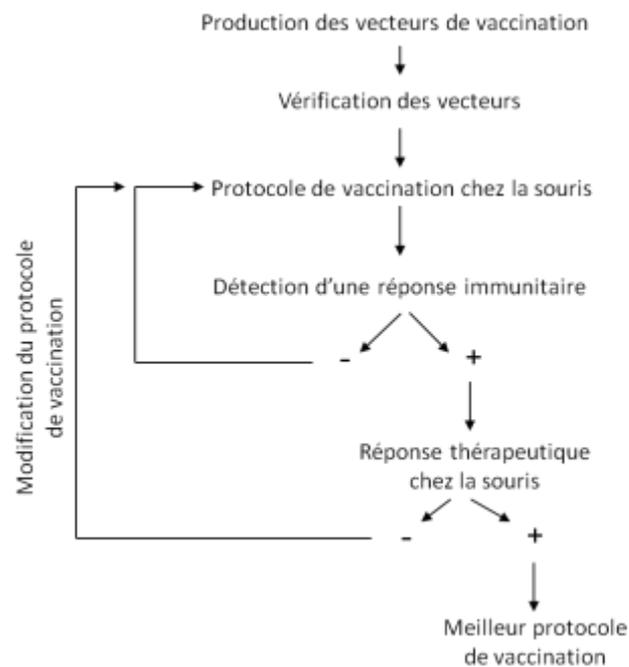
Au sein de l'unité Inserm U948 de « Biothérapies hépatiques », des approches d'immunothérapie du CHC basées sur des vecteurs exprimant l'AFP ont déjà été développées. Il s'agit de vecteurs viraux comme des lentivirus et des adénovirus recombinants, de bactéries ou de vecteurs synthétiques comme le co-polymère à bloc ADN/704 (McIlroy et al., 2009). Le projet d'immunothérapie développé ici est basé sur l'utilisation d'un vecteur viral recombinant MVA exprimant l'AFP. Cette approche originale permet d'exploiter l'expertise de la société Transgene dans la production de vecteurs viraux d'immunothérapie pour le traitement du cancer. Le but du projet est donc d'évaluer les effets immunitaires et thérapeutiques d'une vaccination avec un MVA recombinant exprimant l'AFP dans le modèle murin, la difficulté étant de briser la tolérance à cet antigène. L'étude se compose de trois grandes parties :

- le développement, la production et l'évaluation *in vitro* de vecteurs MVA recombinants exprimant l'AFP ;
- l'évaluation de la réponse immunitaire spécifique de l'AFP induite par l'injection des vecteurs MVA recombinants dans des souris naïves ;
- la détermination de l'efficacité thérapeutique de ces vecteurs dans des modèles murins pertinents de CHC.

L'enjeu du projet est de démontrer la faisabilité de cette approche d'immunothérapie active du CHC dans le modèle murin.

## B. Conduite du projet, stratégies et analyses envisagées

L'idée a été de s'appuyer sur l'expertise des différentes équipes de recherche impliquées. Ainsi, la première partie du projet consistant en la construction et la production des vecteurs viraux recombinants a été réalisée au sein des laboratoires de recherche de la société Transgene. L'évaluation de la réponse immunitaire induite et de l'efficacité thérapeutique a été faite au sein de l'équipe Inserm U948 où l'analyse d'autres vecteurs d'immunisation est réalisée et où des modèles murins pertinents du CHC sont utilisés. L'arbre décisionnel pour la conduite du projet est présenté dans la **figure 33**.



**Figure 33 : Arbre décisionnel du projet.**

Le principal facteur de risque du projet est l'éventuelle incapacité à surmonter la tolérance du système immunitaire murin vis-à-vis de l'AFP. Pour tenter d'y pallier, la stratégie a été de produire plusieurs vecteurs MVA recombinants exprimant différentes formes de l'antigène. Ainsi, trois formes différentes de l'AFP murine ont été insérées dans le vecteur viral : la forme native sécrétée, une forme intracellulaire délétée du signal peptide et une forme transmembranaire où la séquence native de l'AFP est fusionnée à un domaine transmembranaire du virus de la rage. L'objectif est de favoriser la présentation de différents épitopes de l'AFP. De plus, afin de réaliser des expériences de xénoimmunisation, la séquence humaine de l'AFP a été insérée dans un MVA recombinant. Tous ces vecteurs

doivent exprimer une forme stable de l'antigène favorisant ainsi la présentation croisée, voie principale de présentation antigénique par les MVA.

L'analyse *in vivo* de la réponse immunitaire est réalisée après immunisation de souris naïves. Plusieurs protocoles de vaccination simples ou en prime-boost sont envisagés et le suivi est réalisé par Elispot IFN $\gamma$  et par dosage des anticorps anti-AFP. L'efficacité thérapeutique des vaccinations est évaluée dans un modèle orthotopique et un modèle chimiquement induit de CHC murin.

### C. Imagerie des vecteurs d'immunisation

En plus du projet d'immunothérapie basé sur l'AFP, le projet est également constitué d'un volet imagerie. L'objectif est de suivre dans le temps la biodistribution et l'expression du virus recombinant après une injection *in vivo* chez la souris. Dans ce but, un MVA recombinant exprimant le symporteur NIS a été construit et produit.

NIS appartient à la famille des symporteurs sodium/soluté dont la force motrice est assurée par un gradient sodium. Cette glycoprotéine de 90 kDa présente 13 domaines transmembranaires et est naturellement exprimée dans l'organisme au niveau de la membrane basolatérale des thyrocytes, des cellules épithéliales des glandes salivaires et des cellules épithéliales sécrétrices de mucus de l'estomac. Le symporteur NIS assure notamment l'entrée d'iode au niveau de la thyroïde et de ce fait conditionne la synthèse des hormones T3 et T4.

D'autre part, ces propriétés font du NIS un gène rapporteur en biothérapie (Baril et al., 2010) et un transgène thérapeutique en radiothérapie médiée par la thérapie génique (Hingorani et al., 2010). Il est en effet utilisé comme gène rapporteur pour l'imagerie par PET (positron emission tomography) et SPECT (single photon emission computed tomography) en association avec l'injection de sondes radioactives ( $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ...). L'avantage réside dans le fait que l'on puisse ainsi suivre de manière non invasive et répétable l'expression d'un transgène dans le temps. De plus, depuis 40 ans, NIS est utilisé en clinique pour la scintigraphie et la radiothérapie des cancers de la thyroïde.

L'enjeu de ce projet d'imagerie est de voir s'il est possible de suivre par SPECT via l'incorporation de sondes radioactives l'expression du symporteur NIS codé par le MVA recombinant.

# Matériel et Méthodes

### III. Matériel et méthodes

#### A. Construction moléculaire des vecteurs MVA

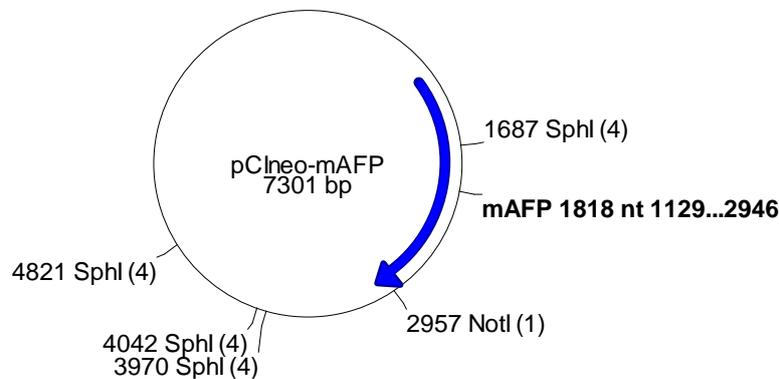
##### 1. Obtention des séquences nucléotidiques d'intérêt

Les séquences d'intérêt utilisées pour l'ensemble du projet proviennent de quatre plasmides d'expression décrits dans le **tableau 15**.

Plasmide	Origine	Séquence d'intérêt	Provenance
pCIneo-mAFP	pCIneo (Promega)	AFP murine	Dr S. Conchon
pCMV Sport6 hAFP	pCMV Sport6 (Invitrogen)	AFP humaine	Dr S. Conchon
pTG 17441		Domaine transmembranaire (TMR)	Transgene
pIP3 hNIS	pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)	NIS humain	Dr G. Vassaux

**Tableau 15 : Descriptif des plasmides utilisés au cours du projet.**

Toutes les constructions plasmidiques contenant l'alpha-foetoprotéine murine ont été réalisées à partir de la séquence de l'AFP murine contenue dans le vecteur pCiNeo-mAFP fourni par le Dr Sophie Conchon. Ce vecteur correspond à l'insertion de la séquence codante native murine de l'AFP (1818 nucléotides) dans le vecteur d'expression pCIneo (Promega, Madison, USA) (**figure 34**).



**Figure 34 : Représentation schématique du plasmide pCIneo-mAFP.**

La séquence de l'AFP humaine a été obtenue à partir du plasmide pCMV Sport6 hAFP fourni par le Dr. S. Conchon. Celui-ci correspond à la séquence codante native humaine de l'AFP (1830 nucléotides) dans le vecteur d'expression pCMV Sport6 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le plasmide pTG 17441, propriété de Transgene, a été utilisé pour obtenir la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire du virus de la rage noté TMR. Enfin, le plasmide pIP3 hNIS fourni par le Dr G. Vassaux correspond à l'insertion

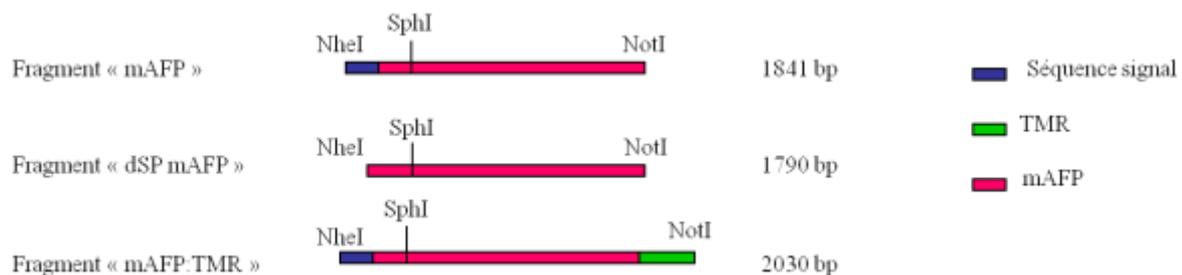
d'une séquence codante humaine du symporteur iode sodium (NIS) dans le plasmide pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).

Toutes les séquences nucléotidiques doivent être par la suite insérées dans un plasmide navette pour la production des vecteurs MVA recombinants. Cette insertion ayant lieu entre les sites enzymatiques *NheI* et *NotI*, toutes les séquences sont générées avec des extrémités *NheI* et *NotI*.

## Projet AFP

Trois séquences nucléotidiques différentes de l'AFP murine ont été générées à partir de la séquence initiale contenue dans pCIneo-mAFP (**figure 35**):

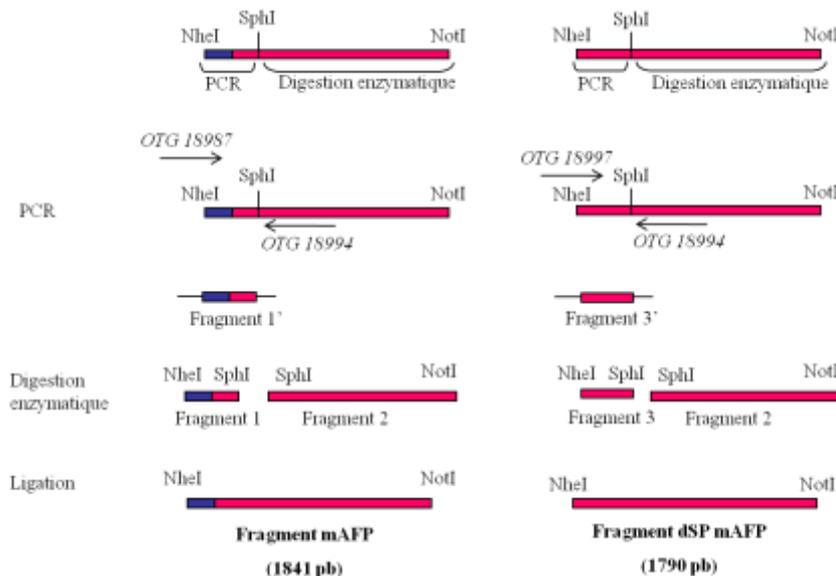
- une séquence nucléotidique non modifiée codant pour l'AFP native sécrétée notée « mAFP » de 1841 nucléotides ;
- une séquence déletée de la séquence signal d'exportation (nucléotides 1 à 54) codant pour une forme intracellulaire de l'AFP murine notée « dSP mAFP » de 1790 nucléotides ;
- une séquence fusionnée à une séquence générant un domaine glycoprotéique transmembranaire (TMR) codant pour une forme transmembranaire de l'AFP notée « mAFP :TMR » de 2030 nucléotides.



**Figure 35 : Représentation schématique des trois fragments murins de l'AFP.**

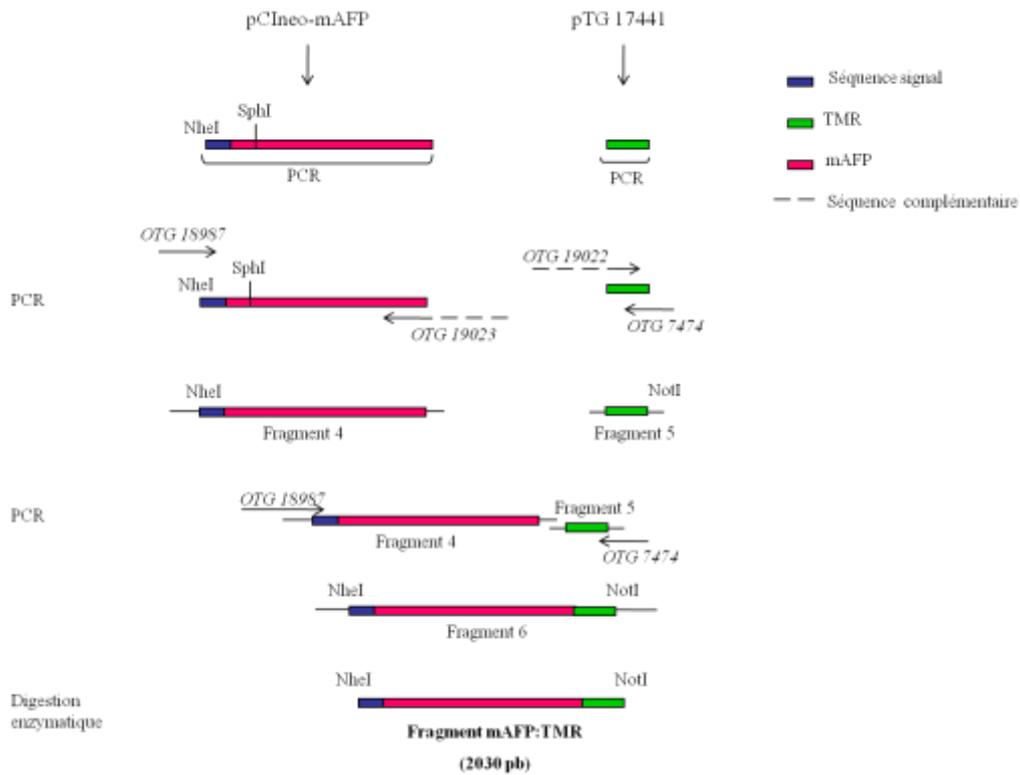
Le site *NotI* du plasmide pCIneo situé 10 nucléotides après la fin de la séquence de l'AFP (cas des séquences « mAFP » et « dSP mAFP ») et le site *NotI* du plasmide pTG 17441 (cas de la séquence « mAFP :TMR ») situé immédiatement après le codon stop du domaine transmembranaire sont utilisés pour fournir l'extrémité *NotI* aux séquences. Le site *NheI* en amont des séquences murines de l'AFP est introduit par PCR grâce à des oligonucléotides contenant le site de restriction de l'enzyme *NheI*.

Les fragments « mAFP » et « dSP mAFP » ont été générés par PCR et digestion enzymatique (**figure 36**). En effet, de façon à limiter le risque d'introduire des mutations, seule une petite partie de la séquence de l'AFP murine est amplifiée par PCR : fragment situé entre le site *NheI* et le site *SphI* de l'AFP. Le reste de la séquence de l'AFP est obtenu par digestion enzymatique avec *SphI* et *NotI*.



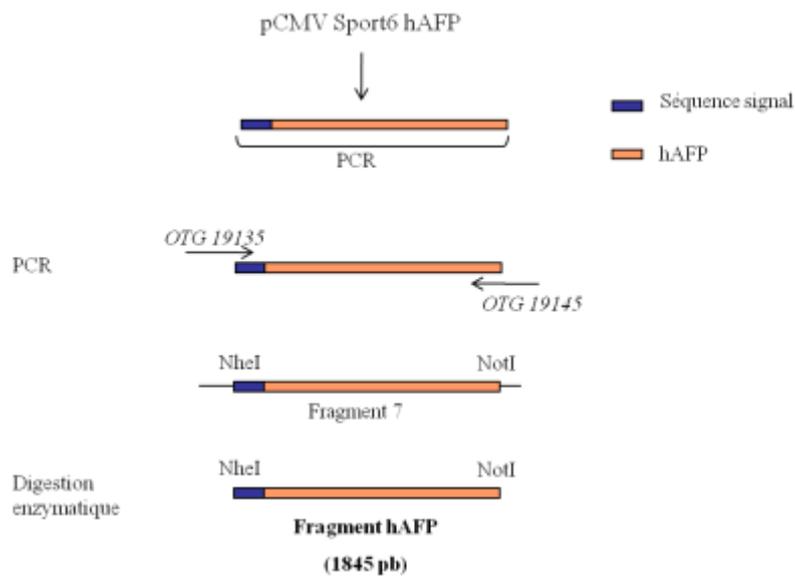
**Figure 36** : Etapes schématiques d'obtention des fragments mAFP et dSP mAFP.

Le fragment « mAFP :TMR » est généré grâce à des PCR successives (**figure 37**). La séquence entière de l'AFP murine est récupérée par PCR à partir du plasmide pCIneo-mAFP. De la même manière, la séquence codant pour le domaine transmembranaire est obtenue par PCR sur le plasmide pTG17441. Les amorces OTG19022 et OTG19023 sont complémentaires, ce qui permet lors d'une troisième PCR d'obtenir le fragment 6 correspondant à la fusion de la séquence native de l'AFP murine avec la séquence du domaine transmembranaire. Une digestion enzymatique *NheI*-*NotI* permet d'obtenir le fragment final « mAFP :TMR ».



**Figure 37 : Etapes schématiques de l'obtention du fragment « mAFP :TMR ».**

Le fragment « hAFP » correspond à la séquence codante native de l'AFP humaine. Il est obtenu par PCR sur le plasmide pCMV Sport6 hAFP puis digestion enzymatique (**figure 38**).



**Figure 38 : Etapes schématiques de l'obtention du fragment « hAFP ».**

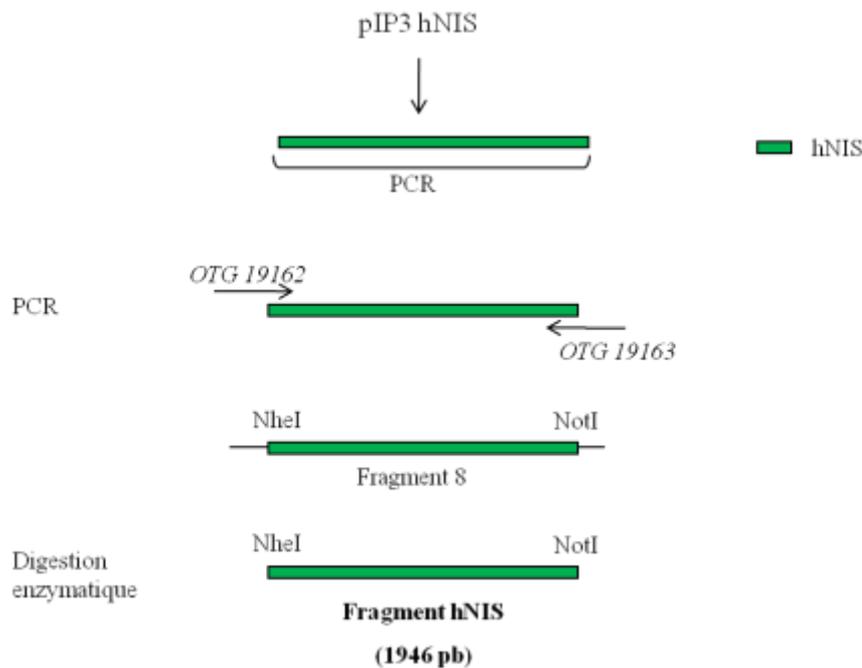
## Projet NIS

Le fragment « hNIS » correspond à la séquence du symporteur NIS humain insérée dans le plasmide fourni par le Dr G. Vassaux. Cette séquence code pour un symporteur fonctionnel et présente 4 mutations ponctuelles par rapport à la séquence théorique de NIS répertoriée dans NCBI (**tableau 16**).

Codon séquence théorique (aa)	Codon séquence pIP3 hNIS (aa)	Position 1 <sup>er</sup> nucléotide
GAG (glu)	CAG (gln)	4
GTC (asp)	GTT (glu)	100
GTG (glu)	GCG (ala)	655
AAC (asn)	AGC (ser)	687

**Tableau 16 :** Mutations ponctuelles dans la séquence humaine du symporteur NIS utilisée par comparaison avec la séquence théorique de NCBI.

La séquence nucléotidique « hNIS » est générée par PCR sur le plasmide pIP3 hNIS puis digestion enzymatique (**figure 39**).



**Figure 39 :** Etapes schématiques de l'obtention du fragment « hNIS ».

### a) *PCR*

Les amorces utilisées pour réaliser les PCR décrites ci-dessus sont présentées dans le **tableau 17**. Le site enzymatique **NheI** utilisé pour le clonage est ajouté en 5' des amorces

avant une séquence consensus kozak de 6 nucléotides (GCCACC) directement en amont de l'ATG. Cette séquence kozak a pour but de favoriser la traduction du transgène en facilitant l'accrochage du ribosome lors de la traduction.

Nom	Sens ou antisens	Séquence 5'-3'	Site enzymatique	Utilisation	Taille produit
OTG 18987	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGAAGTGGATCACACCCGCTTC	NheI	Génération fragment 1'	795 pb
OTG 18994	Anti-sens	GAGCCACATCCAGGGCCAGCTTC			
OTG 18997	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGAAAGCATTGCACGAAAATGAGTT	NheI	Génération fragment 3'	745 pb
OTG 18994	Anti-sens	GAGCCACATCCAGGGCCAGCTTC			
OTG 18987	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGAAGTGGATCACACCCGCTTC	NheI	Génération fragment 4	1860 pb
OTG 19023	Anti-sens	GCAGTCAGGGCCCTGCACTCAGTAATACATAAACGCCCAAAGCATCACGAGTTTTG			
OTG 19022	Sens	CCAAAACCTCGTATGCTTTGGGCGTTTATGTATTACTGAG		Génération fragment 5	650 pb
OTG 7474	Anti-sens	GAATGCACATACATAAGTACCGCATCTCTAGCGAT			
OTG 18987	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGAAAGCATTGCACGAAAATGAGTT	NheI	Génération fragment 6	2450 pb
OTG 7474	Anti-sens	GAATGCACATACATAAGTACCGCATCTCTAGCGAT			
OTG 19135	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGAAGTGGTGAATCAATTTTTTAATTT	NheI	Génération fragment 7	1875 bp
OTG 19145	Anti-sens	GAGTCATTCCTGACTTGCGGCCGCTTAAACTCCCAAAGCAGCAGAGTTTTTG			
OTG 19162	Sens	GGCCGCCTAGCCGCCACCATGCAGGCCGTGGAGACCGGG	NheI	Génération fragment 8	1960 bp
OTG 19163	Anti-sens	GAGTCATTCCTGACTTGCGGCCGCTCAGAGGTTTGCTCTGCTGGTCTC			

**Tableau 17 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.** Légende : **ATGC** Séquence consensus kozak ; **ATGC** Séquence complémentaire ; **ATGC** Site enzymatique.

Les PCR sont réalisées avec le kit Taq DNA polymérase (Qiagen, Hilden, Allemagne). Le mélange réactionnel utilisé pour 50 µL est le suivant :

	Volume	Concentration finale
Tampon 10X	5 µL	1 X
dNTP 10nM	1,5 µL	0,3 nM
Amorces sens (10µM)	3 µL	0,2 µM
Amorces anti-sens (10µM)	3 µL	0,2 µM
Taq polymérase	1 µL	5 unités
ADN matrice (10 ng/µL)	5 µL	
H2O	qsp 50 µL	

Le programme PCR suivant a été utilisé avec une répétition de 15 cycles pour les fragments 4, 6, 7 et 8 et une répétition de 20 cycles pour les autres fragments:

Dénaturation initiale	98°C	45 secondes	} 15 ou 20 cycles
Dénaturation	98°C	20 secondes	
Hybridation	55°C	35 secondes	
Elongation	72°C	45 secondes	
Elongation finale	72°C	3 minutes	

### *b) Purification des produits PCR*

Une purification des produits PCR est réalisée afin d'éliminer la matrice ADN, les éventuels produits PCR non-spécifiques, les dimères de primers et les oligonucléotides non incorporés. La totalité des produits PCR est déposée sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (BET). Après une migration de 30 mn à 160 volts, la bande correspondant au produit PCR d'intérêt est excisée sous UV. L'ADN est purifié grâce au kit Qiaquick PCR (Qiagen) selon le protocole du fabricant. Brièvement, l'agarose récupéré est solubilisé dans un tampon approprié pendant 10 minutes à 56°C. Un volume d'isopropanol est ajouté et le mélange est déposé sur une colonne de silice. Lors de l'étape de centrifugation (13000 g, 1 minute), l'ADN va être adsorbé sur la membrane de silice tandis que les contaminants et les impuretés vont passés au travers de la membrane. Les sels sont éliminés lors d'un lavage avec 750 µL d'un tampon contenant de l'éthanol. La colonne est de nouveau centrifugée 1 minute à vide pour éliminer toute trace d'éthanol. L'ADN est alors élué dans 50µL de tampon Tris. Les purifications obtenues sont concentrées au Speedvac.

### *c) Digestions enzymatiques*

Toutes les digestions enzymatiques ont été réalisées avec les enzymes de restriction de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) selon le protocole suivant :

ADN plasmidique	3 µg de plasmide ou 10 µL de produit PCR purifié
Enzyme	10 unités
Tampon de l'enzyme	4 µL
(BSA selon l'enzyme)	0,4 µL
H <sub>2</sub> O	qsp 40 µL

Le mélange réactionnel est incubé 2 heures à 37°C. Dans le cas de la digestion de plasmide, le produit de la digestion est purifié sur gel d'agarose (même protocole que pour la purification des produits PCR) de manière à éliminer les plasmides non digérés.

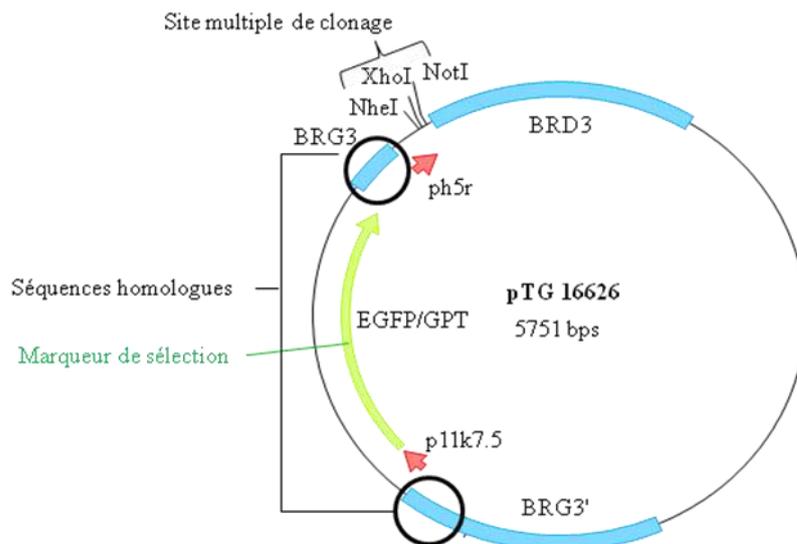
## **2. Clonage des séquences d'intérêt dans le plasmide de transfert**

La production d'un vecteur viral MVA recombinant se fait par recombinaison homologue entre un plasmide de transfert et le virus parental. Le plasmide de transfert, noté

pTG16626 et propriété de Transgene, est utilisé pour cloner les séquences d'intérêt (**figure 40**).

Ce plasmide de transfert contient :

- une cassette de sélection comprenant la fusion entre le gène de la GPT et le gène de la GFP sous contrôle du promoteur p11k7.5 pour permettre une sélection positive puis négative des mutants recombinants
- un bras de recombinaison droit BRD3
- un bras de recombinaison gauche BRG3'
- une région répétée au bras de recombinaison gauche BRG3 qui permettra la suppression, par recombinaison homologue de la cassette de sélection EGFP/GPT
- un site multiple de clonage sous contrôle du promoteur ph5R dans lequel sont insérées les séquences d'intérêt et qui comprend notamment les sites de restriction des enzymes NotI, XhoI et NheI.



**Figure 40 : Carte schématique du plasmide de transfert pTG16626.**

#### a) *Ouverture du plasmide de transfert*

Le plasmide de transfert est linéarisé, dans un premier temps, suite à une digestion enzymatique par NotI durant 2 heures à 37°C selon le protocole suivant :

ADN plasmidique	20 µg de plasmide
Enzyme NotI	100 unités
Tampon II 10X	15 µL
H <sub>2</sub> O	qsp 150 µL

Le produit de digestion est ensuite digéré pendant 2 heures à 37°C par l'enzyme NheI par ajout de :

Enzyme NheI	100 unités
Tampon II 10X	15 µL
BSA	3 µL
H <sub>2</sub> O	qsp 150 µL
Volume réactionnel final	300 µL

De façon à éviter que le plasmide ne se recircularise, des phosphatases (New England Biolabs) sont ajoutées au volume réactionnel final de 300 µL et l'ensemble est incubé pendant 30 minutes à 37°C:

Phosphatases	5 µL
Tampon phosphatases 10X	10 µL
H <sub>2</sub> O	qsp 100 µL
Volume réactionnel final	400 µL

Le plasmide pTG16626 digéré par NheI et NotI est purifié sur gel d'agarose (même protocole que pour la purification des produits PCR) de manière à éliminer les plasmides non ou mal digérés ainsi que les différentes enzymes.

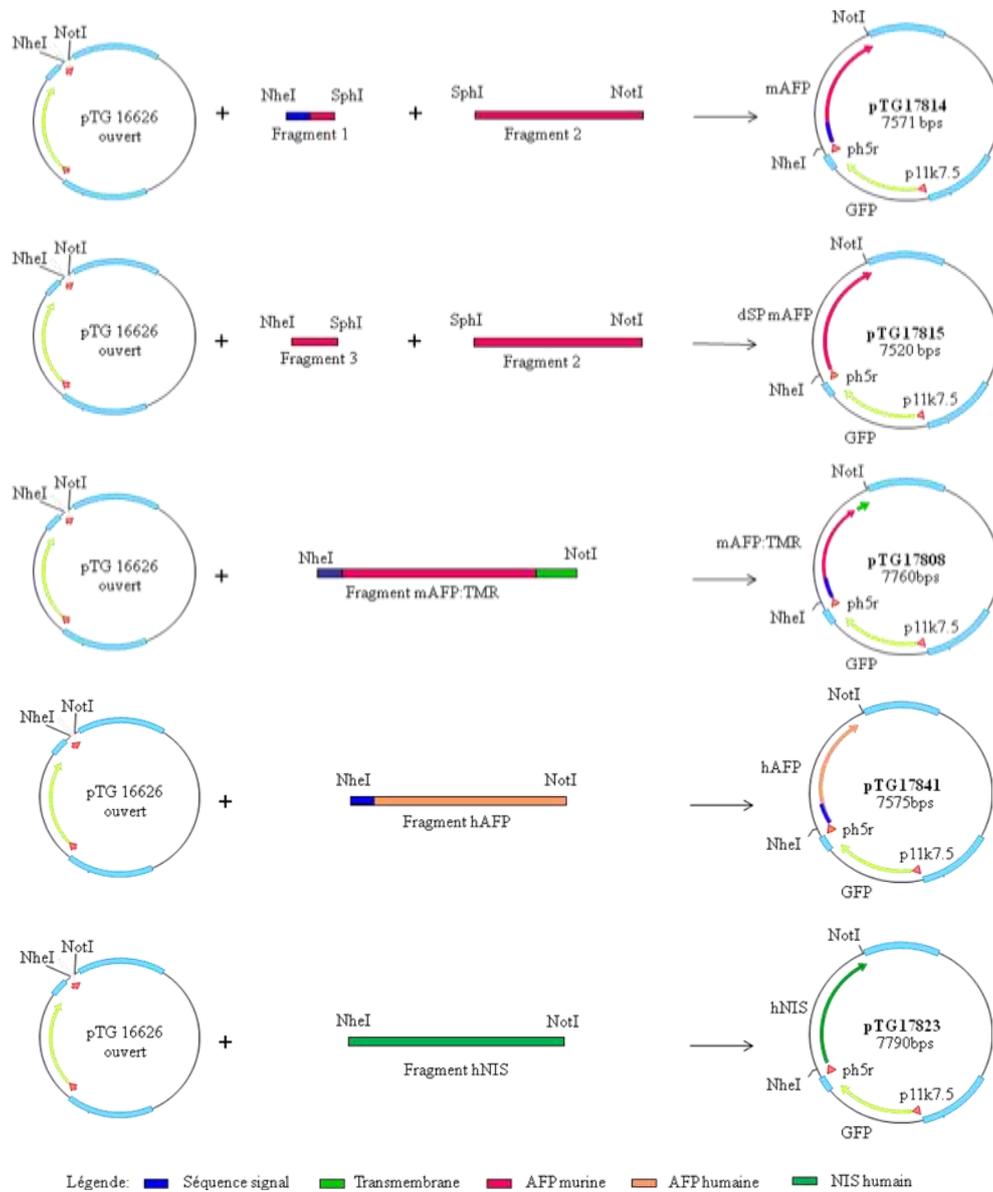
### *b) Ligation*

Les ligations entre le plasmide de transfert et les inserts d'intérêt sont réalisées entre les sites enzymatiques NheI et NotI présents dans le site multiple de clonage du plasmide navette.

Elles sont réalisées avec la T4 DNA ligase (New England Biolabs) dans un volume réactionnel de 20 µL avec 50 à 100 ng de vecteur et un ratio insert:vecteur de 3:1, 2 µL de tampon ligase 10X et 1 µL de ligase. Le volume est complété à 20 µL avec de l'eau. Les réactions de ligation sont effectuées à température ambiante pendant 1 heure et trente minutes. La ligase est désactivée lors d'une incubation de 10 minutes à 65°C.

Les ligations sont contrôlées en réalisant une digestion par XhoI dont il existe un unique site de restriction au sein du plasmide navette qui est situé dans le site multiple de clonage entre les sites de restriction des enzymes NheI et NotI. Aux 20 µL du mélange de ligation sont ajoutés 1 µL de l'enzyme XhoI, 1 µL de tampon III 10X et 8 µL d'eau. La digestion est réalisée pendant 1 heure et trente minutes à 37°C.

L'ensemble des ligations réalisées est récapitulé dans la **figure 41**.



**Figure 41 : Récapitulatif des ligations dans le plasmide de transfert.**

### c) Transformation

Pour les transformations bactériennes, 15  $\mu$ L de produit de ligation sont ajoutés dans 200  $\mu$ L de bactéries chimio-compétentes E.Coli C600 (Stratagene, Santa Clara, USA). Le mélange est incubé 5 minutes dans la glace, puis soumis à un choc thermique d'une minute à 37°C. Après 5 minutes sur glace, 20 et 180  $\mu$ L de bactéries transformées sont étalées sur deux boîtes LB-Agar avec 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline. Ces boîtes sont incubées à 37°C toute la nuit. Dix colonies bactériennes sont inoculées chacune dans 2 mL de milieu LB avec de

l'ampicilline à 100 µg/mL. Les colonies sont mises en mise en culture sous agitation à 37°C pendant 6 heures.

Les minipréparations de plasmides sont effectuées à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen à partir des 2 mL de culture bactérienne. L'élution de l'ADN est réalisée dans 50 µL de tampon d'élution puis l'échantillon est concentré au speedvac à un volume final d'environ 20 µL.

Les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique puis migration sur gel d'agarose en choisissant des enzymes de restriction permettant de différencier le profil de digestion du plasmide attendu de celui du plasmide navette vide ou de plasmides aberrants.

Les bactéries E.Coli C600 sont transformées avec les clones plasmidiques vérifiés. Des préparations de plasmides à grande échelle sont réalisées avec le kit Nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel, Hoerd, France) à partir de 250 mL de culture bactérienne (obtenue par inoculation de 2 mL de préculture dans 250 mL de LB ampicilline et incubation sur la nuit à 37°C sous agitation). Les éluions sont effectuées dans 500 µL d'H<sub>2</sub>O.

Les plasmides de transfert obtenus par maxipréparation sont dosés, vérifiés par digestion enzymatique et migration sur gel et séquencés au sein du département de séquençage de Transgene. Les constructions plasmidiques sont répertoriées dans le **tableau 18**.

Nom du plasmide de transfert	Taille	Insert	Schéma de la construction
<b>pTG mAFP:TMR</b> (pTG 17808)	7760 bp	mAFP:TMR	
<b>pTG mAFP</b> (pTG 17814)	7571 bp	mAFP	
<b>pTG dSP mAFP</b> (pTG 17815)	7520 bp	dSP mAFP	
<b>pTG hAFP</b> (pTG 17841)	7575 bp	hAFP	
<b>pTG hNIS</b> (pTG 17823)	7790 bp	hNIS	

Légende:  Séquence signal  Transmembrane  AFP murine  AFP humaine  NIS humain

**Tableau 18 : Constructions plasmidiques réalisées.**

## B. Production des vecteurs viraux MVA recombinants

La production d'un virus MVA recombinant se fait par recombinaison homologue dans des fibroblastes d'embryon de poulet (CEP) entre un plasmide de transfert et le virus parental. Pour tous les MVA recombinants produits dans ce projet de thèse, un même virus natif est utilisé et sera noté virus parental.

La production se déroule en 4 étapes principales représentées dans la **figure 42**:

- 1) une étape de transfert correspondant à la recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le virus parental ;
- 2) une étape de sélection positive des vecteurs viraux recombinants en trois phases de sélection basée sur l'expression de la cassette EGFP/GPT ;
- 3) une étape de sélection négative des vecteurs viraux recombinants en deux phases de sélection dont le but est d'éliminer la cassette de sélection EGFP/GPT ;
- 4) une étape de purification des vecteurs MVA recombinants.



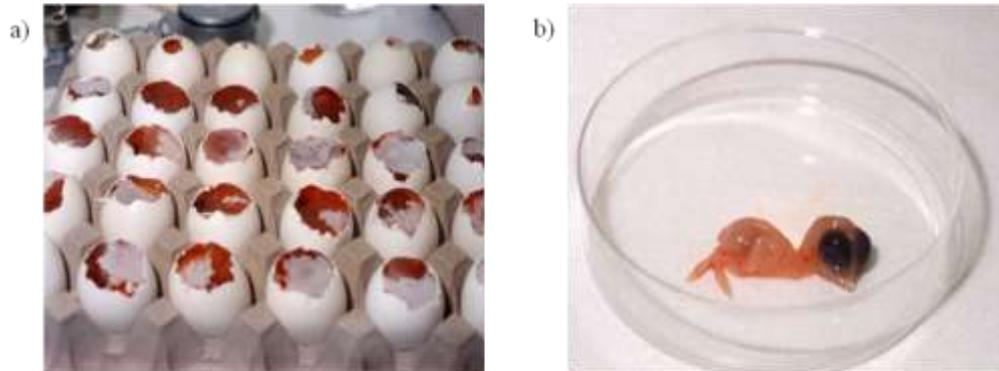
**Figure 42 :** Représentation schématique des 4 principales étapes de production d'un virus MVA recombinant.

### 1. Préparation des cellules embryonnaires de poulet

#### a) *Extraction des embryons de poulet*

La production de virus MVA recombinant est faite dans des cellules embryonnaires de poulet (CEP). Celles-ci sont obtenues à partir d'œufs embryonnés de 11 jours fournis par la société Lohmann (Lohmann, St Fulgent, France).

En condition stérile, la coquille est cassée à l'aide d'une pince au niveau de la poche d'air (**figure 43a**). La membrane vitelline est ensuite percée à l'aide d'une pince et l'embryon est prélevé (**figure 43b**).



**Figure 43 : Préparation des cellules embryonnaires de poulet.** a) Ouverture de la coquille des œufs de poulets au niveau de la poche d'air. b) Embryon de poulet de 11 jours.

Les pattes et la tête de l'embryon sont éliminées et le reste de l'embryon est dilacéré manuellement à l'aide de ciseaux dans un bécher. Trois à quatre rinçages avec du PBS (Gibco, Invitrogen) sont réalisés pour éliminer les globules rouges. Lorsque la solution de lavage est claire, un dernier rinçage au PBS est réalisé et le mélange est mis à décanter pendant 2 à 3 minutes. Le dilacérat sédimente et le PBS surnageant est éliminé.

#### *b) Digestion des embryons*

La digestion des embryons est réalisée à l'aide d'une solution de TripLE Select (Gibco, Invitrogen) qui contient une protéase recombinante dérivée d'origine bactérienne. Les embryons sont digérés dans une solution de Triple select préchauffée à 37°C. Le mélange est incubé à 37°C sous agitation pendant 2 heures.

#### *c) Mise en culture des CEP*

Après digestion, le surnageant est récupéré et centrifugé. Le culot cellulaire est lavé rapidement avec du PBS pour arrêter l'action du Triple Select. Le culot cellulaire est alors repris dans du milieu de culture MBE (Gibco, Invitrogen) complété avec de la gentamicine, de la L-glutamine et du SVF. La concentration cellulaire est estimée au spectrophotomètre. Les cellules sont incubées pendant 48 heures dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C.

## 2. Transfert

Le transfert est réalisé dans une monocouche de CEP à confluence, 48 heures après la mise en culture. Le transfert se fait en deux étapes correspond dans un premier temps, à l'infection des CEP par le virus parental et, dans un deuxième temps, à la transfection avec le plasmide de transfert navette.

### a) *Infection par le virus parental*

Le nombre de cellules estimées, 48 heures après l'ensemencement, est de  $4 \cdot 10^6$ . Le milieu de culture est aspiré. Les CEP sont infectées avec le virus parental dans un volume de 250  $\mu\text{L}$ /boîte de suspension virale reprise dans du PBS complétement avec des cations et du SVF et préchauffé pendant 10 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Le mélange d'infection est ajouté sur les cellules et laissé en adsorption à température ambiante. A l'issue de ce temps, 2 mL de milieu MBE complétement est ajouté et les cellules sont replacées pendant 1 heure sous atmosphère contrôlée de 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ .

### b) *Transfection avec le plasmide de transfert*

La transfection est réalisée au phosphate de calcium et pour chaque transfert, deux mélanges de transfection sont préparés contenant 2 ou 5  $\mu\text{g}$  de plasmide. Le mélange réactionnel utilisé est préparé comme suit :

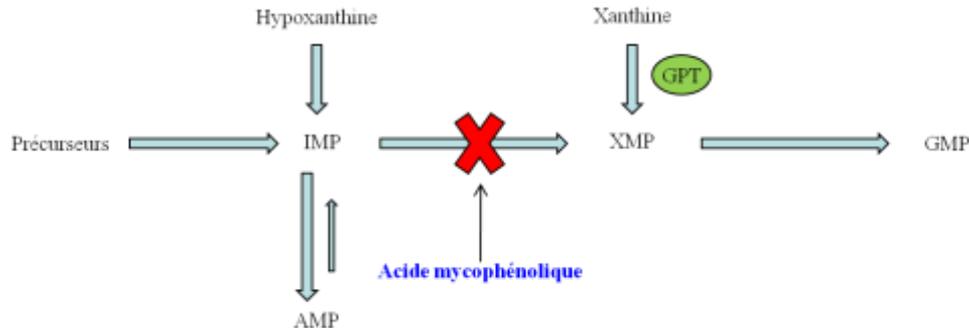
Plasmide de transfert	2 ou 5 $\mu\text{g}$
$\text{CaCl}_2$ 2M	245 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	qsp 280 $\mu\text{L}$ avec le volume d'ADN et de $\text{CaCl}_2$
Hépès 2X	280 $\mu\text{L}$

Le précipité résultant de la complexation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par les groupements phosphates de l'ADN est vérifié au microscope. Le milieu des boîtes de culture des cellules infectées par le virus parental est aspiré et le mélange de transfection sont déposés goutte à goutte sur les CEP et laissés pendant 1 heure à température ambiante. Du milieu MBE complétement est ajouté et les cellules sont replacées à l'étuve pendant 2 heures à  $37^\circ\text{C}$ .

Après aspiration du milieu, un choc au glycérol de 1 minute est réalisé. Après un lavage au PBS cations, 2 mL de milieu MBE complétement sont ajoutés et les cellules sont placées à  $37^\circ\text{C}$  sous atmosphère contrôlée pendant 48 heures.

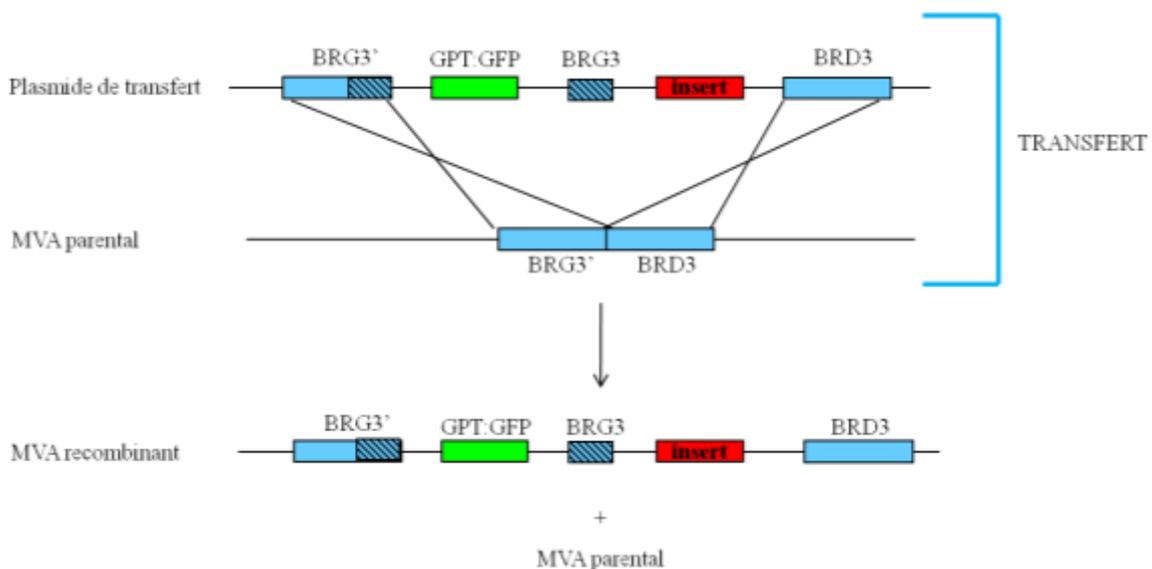
### 3. Sélection positive

Le but de la sélection positive est de sélectionner les virus MVA recombinants. Cette sélection est basée sur l'expression de l'enzyme GPT (xanthine-guanine phosphoribosyl-transférase) et sur la culture en présence d'acide mycophénolique qui est un inhibiteur de la voie de biosynthèse classique des purines (**figure 44**).



**Figure 44 : Voie de biosynthèse simplifiée du guanylate.** AMP : adénosine mono-phosphate ; GMP : guanine mono-phosphate ; GPT : xanthine-guanine phosphoribosyl-transférase ; IMP : inosine mono-phosphate, XMP : xanthine mono-phosphate.

Le gène de la GPT est présent dans la cassette de sélection contenue dans les plasmides de transfert. Lors du transfert, la recombinaison homologe entre le plasmide de transfert et le MVA parental permet de générer des virus MVA recombinants porteurs de la cassette de sélection GPT/GFP contrairement au virus parental (**figure 45**).



**Figure 45 : Représentation schématique de la recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le MVA parental.**

Ainsi, la culture en présence d'acide mycophénolique, de xanthine et d'hypoxanthine des CEP infectées permet de sélectionner uniquement les cellules infectées par les virus recombinants pouvant utiliser la xanthine pour synthétiser du GMP.

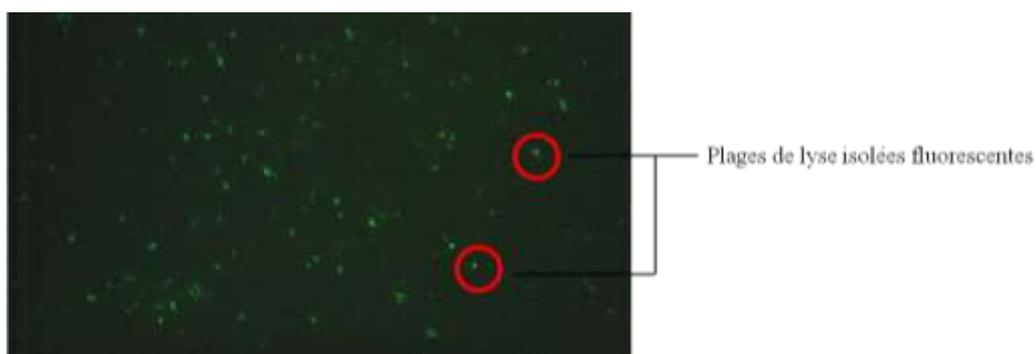
#### *a) Premier sous-clonage*

Quarante huit heures après le transfert, lorsque le tapis cellulaire commence à se détacher, le surnageant et les cellules infectées sont récupérées et soniquées.

Le mélange viral obtenu est utilisé pour réaliser de nouvelles infections de CEP à des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  dans du PBS avec des cations et du SVF. Les infections ont lieu sur des CEP confluentesensemencées 48 heures plus tôt dans des boîtes de culture cellulaire. Le milieu est aspiré et la dilution virale est déposée et laissée en adsorption pendant 30 minutes à température ambiante. Les CEP sont ensuite recouvertes avec du milieu MBE complété et gélosé contenant la pression de sélection (xanthine 10 mg/mL, hypoxanthine 10 mg/mL, acide mycophénolique 10 mg/mL). Les CEP sont cultivées pendant 48 heures sous atmosphère contrôlée de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ .

#### *b) Récupération de plage de lyse*

Quarante-huit heures après le sous-clonage, les boîtes gélosées de culture sont observées sous UV et les plages fluorescentes sont entourées (**figure 46**).



**Figure 46 :** Observation sous UV des plages de lyse fluorescentes 48 heures après infection des CEP sur milieu gélosé.

Pour chaque transfert, on sélectionne 4 plages de lyse fluorescentes pour les infections réalisées avec les dilutions issues du transfert avec 2  $\mu\text{g}$  de plasmide et 4 plages de lyse fluorescentes pour celles réalisées à partir des dilutions issues du transfert avec 5  $\mu\text{g}$  de

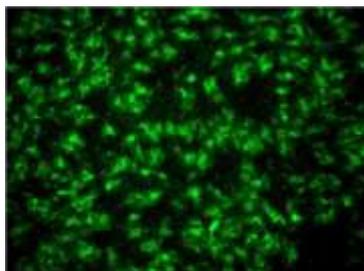
plasmide. La plage de lyse est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur piquée dans la gélose, placée dans 500  $\mu$ L de solution de PBS avec des cations et du SVF et congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$  de façon à dissocier la gélose.

### *c) Amplification des plages de lyse*

L'amplification est faite sur des CEP ensemencées 48 heures plus tôt dans des boîtes de culture cellulaire de 3 cm de diamètre. Le milieu est aspiré et les 500  $\mu$ L de solution de PBS avec des cations et du SVF contenant la gélose et la plage de lyse sont déposés au goutte à goutte et laissés en adsorption pendant 30 minutes à température ambiante. Les CEP sont alors recouvertes de 2 mL de milieu MBE complété et contenant la sélection (gentamycine 4g/L, L-glutamine 200mM, SVF 5%, xanthine 10 mg/mL, hypoxanthine 10 mg/mL, acide mycophénolique 10 mg/mL) et placées à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  pendant 72 heures.

### *d) Contrôle de la sélection par PCR*

Soixante douze heures après l'amplification, la fluorescence est contrôlée sous UV (**figure 47**). Les boîtes de culture sont alors congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  de façon à réaliser une lyse cellulaire. Après décongélation, le tapis cellulaire contenant la solution virale est repris et le mélange est soniqué pour libérer les particules virales contenues dans les cellules (5 secondes de pulse et 1 seconde d'arrêt pendant 40 secondes à  $40^{\circ}\text{C}$ ).



**Figure 47 :** Observation sous UV de l'amplification des plages de lyse fluorescentes 72 heures après infection des CEP.

En plus de la sélection basée sur la cassette GPT/GFP, un contrôle par PCR est réalisé. Dans ce but, des infections de CEP ensemencées 24 heures plus tôt dans des boîtes de culture de 3 cm de diamètre sont réalisées. Après aspiration du milieu, 40  $\mu$ L de suspension virale

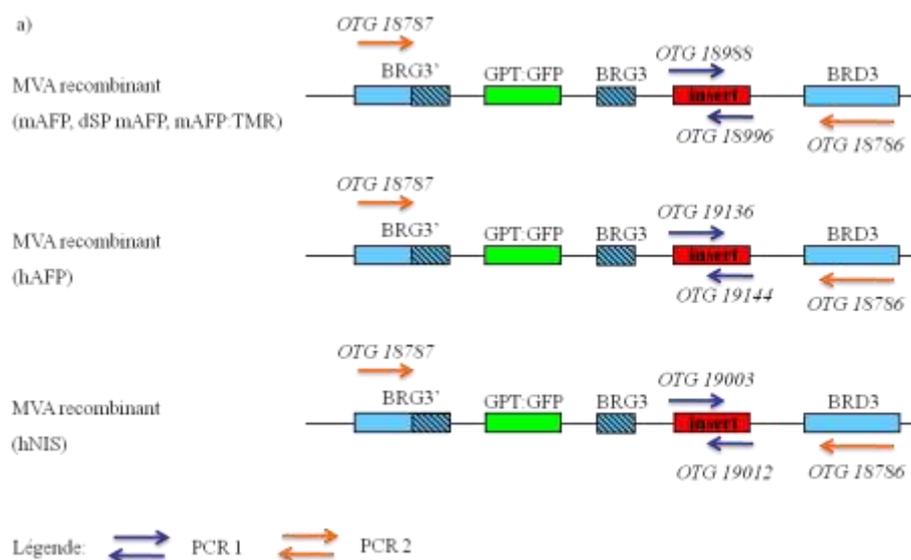
sont déposés en présence de 200  $\mu$ L de PBS contenant des cations et du PBS et laissés en adsorption pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules infectées sont ensuite incubées entre 18 et 24 heures à 37° en présence de milieu MBE complété mais sans pression de sélection. Une fois la lyse des CEP observées sous microscope et le niveau d'infection contrôlée sous UV, le milieu est éliminé et les cellules infectées sont congelées à -20°C.

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du kit DNeasy Tissue kit (Qiagen). Brièvement, pour permettre une lyse complète des cellules infectées et des virus tout en préservant l'ADN, les cellules sont reprises dans :

- 200  $\mu$ L de tampon de lyse 2X (2,5 mL Tris 2M, 200  $\mu$ L EDTA 0.5M, 27 gramme de sucrose, 10 mL SDS 10%, H<sub>2</sub>O qsp 50 mL)
- 200  $\mu$ L de TE pH8
- 10  $\mu$ L de protéinase K 20 mg/mL
- 4  $\mu$ L de RNase A 100mg/mL.

L'ADN est alors extrait sur les colonnes du kit. L'ADN est élué dans 150  $\mu$ L de tampon d'éluion.

Deux contrôles par PCR sont effectués (**figure 48**). Une première PCR (PCR 1) comprend des amorces s'hybridant à l'intérieur de l'insert et permet de vérifier la présence de l'insert d'intérêt. Une deuxième PCR (PCR 2) comprend des amorces s'hybridant dans les régions flanquantes de la zone d'insertion sur les régions BRG3 et BRD3 et permet de contrôler l'absence du virus parental.



b)

Nom	Sens ou antisens	Séquence 5'-3'	Détection
OTG 18787	Sens	CCAGCGTCTACATGACGAGCTTC	virus parental
OTG 18786	Anti-sens	GTACCGGCATCTCTAGCAGTC	
OTG 18988	Sens	CTCCAGTGC GTGACGGAGA	Insert mAFP, dSP mAFP, mAFP:TMR
OTG 18996	Anti-sens	CTGATACCAGAGTTCACAGG	
OTG 19136	Sens	GTTTAGCTGACCTGGCTACCA	Insert hAFP
OTG 19144	Anti-sens	ATGTCTGATACATAAGTGTCC	
OTG 19003	Sens	GGGCTGGCTCGGGCGGG	Insert hNIS
OTG 19012	Anti-sens	GTCCAAGAGCCAGCCCCCTC	

**Figure 48 : a) Représentation schématique des PCR contrôles réalisées lors de la sélection positive. b) Liste des amorces utilisées.**

Les PCR sont réalisées avec le kit Taq DNA polymérase (Qiagen) et les amorces décrites dans la figure 48. Le mélange réactionnel est le suivant :

	Volume	Concentration finale
Tampon 10X	5 µL	1 X
dNTP 10nM	1,5 µL	0,3 nM
Amorces sens (10µM)	3 µL	0,2 µM
Amorces anti-sens (10µM)	3 µL	0,2 µM
Taq polymérase	1 µL	5 unités
Suspension d'ADN total	10 µL	
H <sub>2</sub> O	qsp 50 µL	

Le programme PCR utilisé est constitué des étapes suivantes :

Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	} 38 cycles
Dénaturation	95°C	45 secondes	
Hybridation	58°C	45 secondes	
Elongation	72°C	45 secondes	
Elongation finale	72°C	3 minutes	

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose contenant du BET et leur taille est analysée par électrophorèse.

*e) Cycles suivants de sous-clonage*

Une fois les clones sélectionnés par PCR pour l'expression de l'insert d'intérêt et l'absence de virus parental, les solutions virales dont ils sont issus sont utilisées pour un nouveau cycle d'infection de CEP. Des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  dans du PBS avec des cations et du SVF servent à l'infection de CEP dans des boîtes de culture de 5 centimètres de diamètres à raison de 500  $\mu$ L de dilution virale par boîte. Les CEP sont ensuite recouvertes de milieu MBE complété, gélosé et contenant la pression de sélection et mises à incuber pendant 48 heures. Des clones GFP sont de nouveau récupérés et servent à réaliser un deuxième cycle de sélection GPT/GFP. Trois cycles de sélection positive sont nécessaires pour obtenir un clone valide.

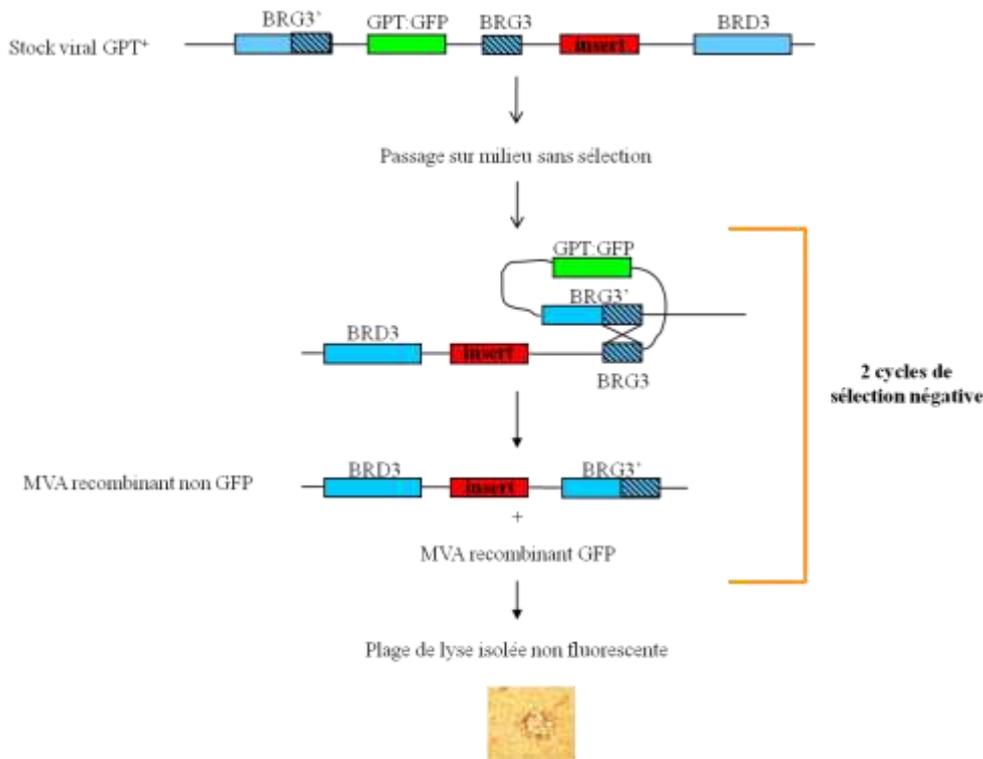
*f) Constitution d'un stock viral GPT+*

A l'issue du dernier cycle de la sélection positive, un stock viral noté stock GPT<sup>+</sup> est constitué en infectant sans pression de sélection, 2 flasques de 175 cm<sup>2</sup> avec 5 mL de suspension virale non diluée du clone valide. Les cellules infectées sont récupérées 48 heures plus tard et la suspension virale est soniquée.

Une titration de ce stock GPT<sup>+</sup> est réalisée en infectant des CEP ensemencées avec 500  $\mu$ L de dilution virale ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) du stock. Les dilutions sont laissées en adsorption pendant 30 minutes à température ambiante puis les CEP sont recouvertes de milieu MBE complété, gélosé sans sélection. La détermination du titre du stock GPT<sup>+</sup> est faite 48 heures après infection par comptage du nombre de plages fluorescentes aux trois dilutions. Un contrôle par PCR de l'expression de l'insert et de l'absence de virus parental est réalisé sur ce stock GPT<sup>+</sup> ainsi qu'un séquençage de l'insert intégré dans le génome viral.

#### 4. Sélection négative

La sélection négative a pour but d'éliminer la cassette GPT/GFP par recombinaison homologue. Elle se fait généralement en deux étapes successives de sélection (**figure 49**).

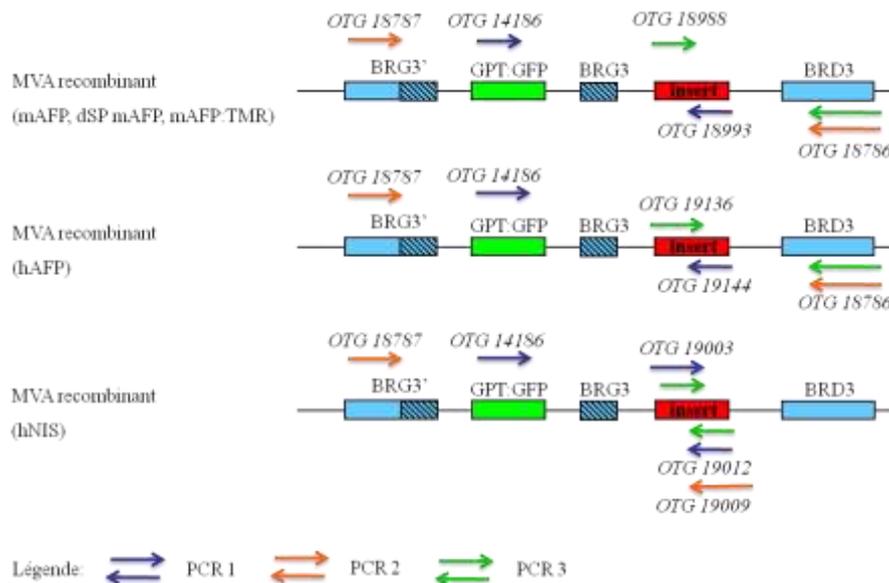


**Figure 49 :** Représentation schématique de la sélection virale négative par recombinaison homologue.

Dans un premier temps,  $5 \cdot 10^7$  CEP sont infectées à  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  pfu avec le stock viral GPT<sup>+</sup> dans du MBE complété sans pression de sélection. Soixante douze heures après l'infection, le tapis cellulaire et le surnageant sont récupérés et soniqués, puis utilisés pour réaliser la première sélection négative.

Les suspensions virales obtenues à partir des infections à  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  du stock viral GPT<sup>+</sup> servent à infecter des CEP respectivement à des dilutions  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  en milieu MBE complété gélosé sans sélection. Après coloration au rouge neutre (4% final) de la gélose, les plages de lyse sont repérées à la loupe binoculaire 72 heures après l'infection et les plages sélectionnées sont contrôlées sous UV de façon à éliminer les plages fluorescentes. Les plages de lyse restantes sont alors récupérées dans 500  $\mu$ L de PBS 1% cations 1% SVF et soumises à un cycle de congélation/décongélation de manière à casser la gélose. Le mélange obtenu sert à infecter des CEPensemencées dans des boîtes de culture de 5 centimètres de diamètre. Celles-ci sont observées 48 heures après l'infection et toutes les boîtes présentant de la fluorescence sont éliminées. Dans les boîtes restantes, la présence de

plage de lyse est contrôlée sous loupe binoculaire et après un cycle de congélation/décongélation, les suspensions virales sont soniquées et utilisées pour infecter des CEP afin de réaliser un contrôle par PCR selon le même protocole que lors de la sélection positive (**figure 50**).



**Figure 50 : PCR réalisées pour le contrôle de la sélection négative.**

Les clones sélectionnés par PCR sont utilisés pour réaliser le deuxième cycle de sélection négative.

A l'issue du dernier cycle de la sélection négative, un stock viral noté stock GPT<sup>-</sup> est constitué en infectant sans pression de sélection des CEP avec la suspension virale non diluée du clone valide. Les cellules infectées sont récupérées 48 heures plus tard et la suspension virale est soniquée.

Une titration de ce stock GPT<sup>-</sup> est réalisée en infectant des CEPensemencées sur des boîtes de 5 centimètres de diamètre avec 500 µL de dilution virale ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) du stock. Les dilutions sont laissées en adsorption pendant 30 minutes à température ambiante puis les CEP sont recouvertes de milieu MBE complété, gélosé sans sélection. La détermination du titre du stock GPT<sup>-</sup> est effectuée 48 heures après infection par comptage du nombre de plages de lyse aux trois dilutions. Un contrôle par PCR de l'expression de l'insert et de l'absence de virus parental est réalisé sur ce stock GPT<sup>-</sup> ainsi qu'un séquençage de l'insert intégré dans le génome viral.

## 5. Purification

Après infection d'une grande quantité de CEP à une faible MOI, les cellules sont récoltées et centrifugées 15 minutes à 1200 g. Les culots cellulaires sont alors congelés et le surnageant conservé à 4°C.

Au jour 1, les culots cellulaires sont décongelés et repris dans un tampon hypotonique nécessaire pour la destruction des cellules et la libération des particules virales. Le mélange est soniqué et complété avec le surnageant de culture conservé à 4°C. Un premier coussin de 180 mL de sucrose à 36% est déposé dans le fond d'un pot Nalgene en polycarbonate. Les coussins de sucrose permettent d'isoler les particules virales du reste des débris cellulaires. L'ensemble est centrifugé pendant 18 heures à 3900g à 4°C.

Au jour 2 de la purification, les pots sont décantés et chaque culot viral est repris dans 20 mL de Tris 10mM pH8. L'ensemble des culots est alors regroupé et soniqué pendant 30 secondes. Les culots sont alors dilués avec du Tris 10mM pH8. Un deuxième coussin de 180 mL de sucrose à 36% est déposé au fond de chaque pot. L'ensemble est centrifugé pendant 18 heures à 3900 g à 4°C.

Au jour 3, les pots sont décantés et chaque culot viral est repris dans 25 mL de Tris 10mM pH8. Les culots sont regroupés, soniqués pendant 30 secondes et l'ensemble est dilué avec du Tris 10mM pH8. Les culots viraux sont alors purifiés sur gradient de sucrose dans des pots Nalgène. Au dessus de chaque gradient, 180 mL de suspension virale sont déposés et l'ensemble est centrifugé pendant 5h30 à 3900g. A la fin de la centrifugation, les bandes virales blanchâtres correspondant à la suspension virale sont prélevées et diluées au 1/3 dans du Tris 10 mM pH8. Le mélange est centrifugé pendant 18 heures à 3900 g à 4°C.

Au jour 4, le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans du tampon de formulation dans un volume adéquat de manière à obtenir une solution virale concentrée et purifiée. La solution est soniquée pendant 30 secondes et conservées à -20°C. Selon le même protocole que pour la titration des stocks GPT<sup>+</sup> et GPT<sup>-</sup>, des CEP sont infectées avec la solution virale concentrée aux dilutions 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-8</sup>. La détermination du titre viral est faite par lecture du nombre de plage de lyse 48 heures après l'infection.

## 6. Vérification de l'expression du transgène *in vitro*

### a) Western Blot

L'expression du transgène est contrôlée *in vitro* par Western Blot sur les stocks GPT<sup>+</sup>, GPT<sup>-</sup> et sur le stock viral purifié. Des CEPensemencées en boîte de culture de 3 centimètres de diamètre sont infectées à 0,2 pfu/cellule. Le surnageant est éliminé 48 heures plus tard et le tapis cellulaire est congelé à -20°C. Les cellules sont alors reprises dans 400 µL de tampon Tris glycine SDS (Invitrogen) et soniquées pendant 20 secondes.

Les échantillons protéiques (20 µL) repris dans du tampon de charge supplémenté par 10% β-mercaptoéthanol sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes et déposés dans un gel d'acrylamide 10% Bis-Tris (Invitrogen). La migration est réalisée dans des cuves XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) dans du tampon MOPS (Invitrogen) à 150 volts pendant 1 heure. Un marqueur de taille protéique (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) est également déposé.

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) par transfert semi-liquide, dans du tampon de transfert (20% d'éthanol, 48 mM Tris, 39 mM glycine, 3,75 mM SDS). Les sites de fixation aspécifiques des anticorps sont bloqués par incubation de la membrane dans du PBS SVF 5% Tween 20 0.5% pendant 2 heures. Les anticorps sont dilués dans du tampon PBS SVF 5% Tween 0.5%. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 1 heure sous agitation (**tableau 19**). Trois rinçages au PBS sont effectués avant d'incuber la membrane avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure sous agitation (**tableau 20**). L'excès d'anticorps secondaire est éliminé par trois lavages de 15 minutes au PBS. La membrane est finalement incubée pendant 30 minutes dans une solution de PBS contenant un complexe peroxydase biotine streptavidine au 1/1000<sup>ème</sup> (GE Healthcare). La révélation est réalisée par incubation de 5 minutes de la membrane dans de l'ECL plus (GE Healthcare) et le film est obtenu à l'aide d'un développeur.

Protéine détectée	Référence et Fournisseur	Dilution de l'anticorps	Espèce dont provient l'anticorps
mAFP, dSP mAFP, hAFP	sc-8108, Santa-cruz	1/1000	chèvre
mAFP:TMR	Transgene	1/2000	lapin

**Tableau 19 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western Blots.**

<b>IgG ciblées</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution de l'anticorps</b>
Anti-chèvre	Santa-cruz	1/500
Anti-lapin	Santa-cruz	1/1000

**Tableau 20 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western Blots.**

### *b) Immunofluorescence*

#### (1) Mise en évidence de l'AFP

Les immunofluorescences pour visualiser l'AFP exprimée par les MVA recombinants sont réalisées sur des cellules de hamster BHK21ensemencées la veille à  $1,2 \cdot 10^4$  cellules par puits. Les cellules sont infectées 24 heures après l'ensemencement à une MOI de 1,5. Le lendemain, un lavage au PBS est effectué de façon à éliminer l'excès de virus et les cellules sont incubées avec 1,5 mL de PBS-EDTA 10mM pendant 1 minute avant d'être reprises et centrifugées pendant 4 minutes à 430 g. Le culot cellulaire est repris dans 100  $\mu$ L de PBS et les cellules sont comptées. Les cellules ( $5 \cdot 10^5$  cellules) sont fixées sur des lames en verre à l'aide du système cytofunnel-cytospin (Thermo Shandon) lors d'une centrifugation de 4 minutes à 1400g. Une étape de fixation est réalisée pendant 20 minutes à 4°C avec du formaldéhyde 4%. Trois rinçages de 5 minutes sont effectués dans du PBS. L'ensemble est incubé pendant 30 minutes à température ambiante avec du PBS lait 0,5% puis lavé trois fois avec du PBS. L'anticorps primaire (anticorps anti-AFP, Santa Cruz) est déposé, dilué au  $1/50^{\text{ème}}$  dans du tampon de saturation et laissé en incubation pendant 1 heure en chambre humide. Après trois rinçages dans du PBS, une incubation de 30 minutes en chambre humide et dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire a lieu. L'anticorps secondaire (Ac rabbit anti-goat Cy3, ref C2821, Sigma) est dilué au  $1/500^{\text{ème}}$  dans du tampon de saturation. Après trois rinçages au PBS, une coloration DAPI à 0,5  $\mu$ g/mL est réalisée pour la visualisation des noyaux. Après deux rinçages au PBS, les lames sont montées du milieu de montage et les marquages sont observés 24 heures plus tard à l'aide d'un microscope à fluorescence.

#### (2) Mise en évidence de NIS

Les immunofluorescences pour visualiser le symporteur NIS sont réalisées sur des cellules Helaensemencées à  $1 \cdot 10^5$  cellules/puits en plaque 6 puits. Les cellules sont infectées le lendemain à une MOI de 0,1 ou 1 avec le MVA hNIS. Le lendemain, un lavage au PBS est effectué de façon à éliminer l'excès de virus et les cellules sont fixées pendant 15 minutes

avec du formaldéhyde à 3% dans du PBS. Après un rinçage rapide, les cellules sont perméabilisées avec du formaldéhyde 3% Triton X-100 0,1% pendant 15 minutes. Après un rinçage au PBS, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire (Anticorps anti- $\alpha$ hNIS Ab-1, Neomarkers) dilué au 1/150<sup>ème</sup> dans du PBS. Après un lavage au PBS, les cellules sont incubées pendant 40 minutes avec l'anticorps secondaire (anticorps FITC anti-mouse, Interchim) dilué au 1/200<sup>ème</sup>. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

### *c) Test de captation d'iode*

La fonctionnalité du symporteur NIS est vérifiée lors d'un test d'incorporation d'iode. Ce test est réalisé sur des cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus (Hela), des cellules murines de mélanome (B16 OVA), des cellules hépatocytaires murines (Hepa 1.6) et humaines (HuH7). Les cellules sontensemencées à  $1.10^5$  cellules/puits dans des plaques 12 puits. Elles sont infectées 24 heures après l'ensemencement avec le MVA hNIS à une MOI de 1. Le jour suivant, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées à l'eau physiologique.

La solution radioactive (solution HBSS, NaI 10  $\mu$ M,  $I^{125}$  7.4 KBq/mL) est préparée sans ou avec perchlorate de sodium (concentration finale 100  $\mu$ M) qui est un inhibiteur spécifique de l'entrée d'iode dans la cellule par le symporteur NIS. Les cellules sont incubées pendant 1 heure avec 1 mL de la solution radioactive à 37°C. A l'issue de l'incubation, la plaque est déposée sur glace pendant 2 minutes. Le milieu radioactif est éliminé et les cellules sont rapidement rincées avec de l'HBSS froid. Le tapis cellulaire est repris dans 500  $\mu$ L de tampon lyse (SDS 0,1%, NaOH 0,1M,  $Na_2CO_3$  2%) et le mélange est déposé dans des tubes en verre. La lecture de la radioactivité est faite à l'aide d'un compteur gamma.

De façon à normaliser les résultats, une expérience d'infection en parallèle est réalisée pour doser les protéines. Vingt-quatre heures après infection, les cellules sont lavées et reprises dans 400  $\mu$ L de tampon RIPA (Tris 10 mM, NaCl 0.15M, EDTA 1 mM, NP40 1%, sodium deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, Complete 1X). Après 1 heure d'incubation dans la glace, le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 13800 g. Le dosage des protéines est fait avec le kit Biorad Dc Protein Assay.

## C. Evaluation de la réponse immunitaire

### 1. Protocole d'immunisation *in vivo*

La recherche d'une réponse immunitaire est faite dans un premier temps sur des souris naïves. Les souris utilisées sont des souris de 8 semaines de souche C57BL/6J et C3H/HeN provenant de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Le protocole d'immunisation classiquement utilisé est présenté sur la **figure 51**. Les animaux sont injectés par voie sous cutanée sur le flanc droit avec  $5.10^7$  pfu (plaque forming unit) de MVA recombinant dans 100  $\mu$ L. Trois injections aux jours 0, 7 et 14 sont réalisées et l'analyse de la réponse immunitaire a lieu au jour 21.



**Figure 51 : Protocole d'immunisation sur les souris naïves.**

Une expérience de prime-boost MVA/Adénovirus a également été réalisée (**figure 52**). La première injection est faite au jour 0 et la deuxième injection au jour 14. Les animaux sont sacrifiés au jour 21 pour la réalisation du test Elispot. Le MVA recombinant est injecté par voie sous cutanée dans le flanc droit à la dose de  $5.10^7$  pfu dans 100  $\mu$ L. L'adénovirus est injecté par voie intramusculaire dans les deux tibias antérieurs (2 x 25  $\mu$ L) pour une dose virale totale de  $1.10^9$  particules infectieuses.



**Figure 52 : Protocole d'immunisation par prime-boost sur les souris naïves.**

Finalement, un essai de déplétion des lymphocytes T régulateurs a été réalisé de manière à déterminer l'éventuel effet inhibiteur de cette population sur la réponse immunitaire (**figure 53**). La déplétion est réalisée lors d'une injection unique la veille de la première immunisation MVA. Elle consiste en l'injection par voie intrapéritonéale de 400  $\mu$ g

d'anticorps anti-CD25 (IgG1 de rat, clone PC-61, Bioexpress Inc.). Cet anticorps, spécifique de la chaîne IL-2R $\alpha$ , provoque la déplétion *in vivo* des cellules CD25<sup>+</sup>. Un protocole classique de trois immunisations de  $5.10^7$  pfu dans 100  $\mu$ L de vecteur MVA par voie sous cutanée a ensuite été suivi.



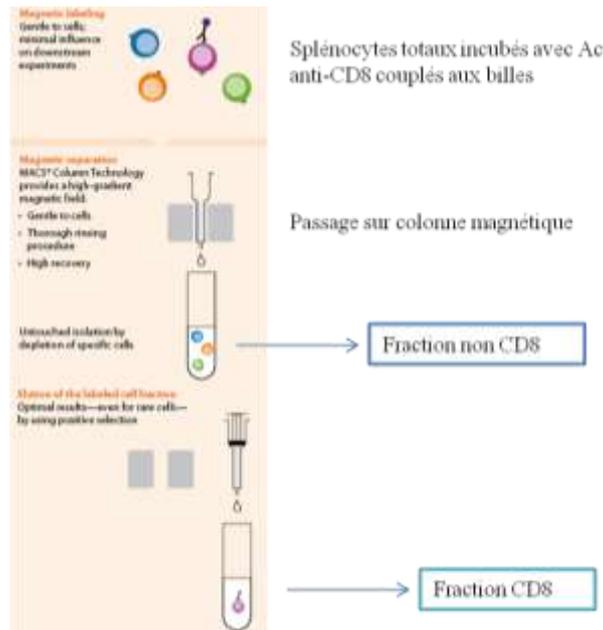
Figure 53 : Protocole d'immunisation avec déplétion des lymphocytes T régulateurs.

## 2. Analyse de la réponse cellulaire

### a) *Elispot*

La rate des animaux immunisés est prélevée au moment du sacrifice. Les splénocytes sont récupérés de manière mécanique en écrasant l'organe à l'aide d'un piston de seringue sur un tamis cellulaire de 100  $\mu$ m (BD Biosciences). Les cellules sont reprises dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) complété avec 10% de SVF (Biowest), 1% pénicilline streptomycine (Gibco) et 1% de glutamine (Gibco). Après une centrifugation de 5 minutes à 430 g, les cellules sont reprises dans 5 mL de tampon de lyse des globules rouges (4.15g NH<sub>4</sub>Cl, 0.5g KHCO<sub>3</sub>, 18.6 mg Na<sub>2</sub>EDTA, qsp 500 mL H<sub>2</sub>O distillée, pH 7.2). La lyse est effectuée pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors centrifugées pendant 5 minutes à 430g.

Un tri des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est réalisé à l'aide du kit CD8a (Ly-2) microbeads mouse (référence 130-049-401, Myltenyi Biotec, Auburn, USA) (**figure 54**). Brièvement, les cellules sont reprises dans 10 mL de tampon MACS (H<sub>2</sub>O, 0,5% BSA, 10% PBS, 2 mM EDTA) et passées au travers d'un tamis cellulaire de 100  $\mu$ m puis de 30  $\mu$ m. Après une centrifugation de 5 minutes à 430 g, les cellules issues d'une rate sont incubées avec 100  $\mu$ L d'anticorps anti-CD8 et 900  $\mu$ L de tampon MACS pendant 15 minutes à 4°C. Les lymphocytes d'intérêt sont récupérés après un tri magnétique.



**Figure 54 : Représentation schématique du tri cellulaire réalisé pour isoler les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. (D'après Miltenyi Biotech).**

La réponse cellulaire est analysée à l'aide du kit murine IFN $\gamma$  Elispot (référence 862.031.020, Diaclone, Besançon, France). Brièvement, après activation de la plaque, l'anticorps de capture est coaté sur la nuit à 4°C. Après trois lavages au PBS, une saturation dans du PBS 2% lait est réalisée pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages au PBS, 100  $\mu$ L de solution d'activation sont déposées par puits et des triplicatas sont réalisés. Les cellules sont restimulées avec :

- le peptide de l'AFP (noté peptide 1, séquence NEFGIASTL) à 4  $\mu$ g/puits ;
- la solution de concanavaline ConA servant de contrôle positif à 5  $\mu$ g/mL ;
- le virus parental à une MOI de 10.

Après dépôt des solutions d'activation, 100  $\mu$ L de la solution de splénocytes ou de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont déposés correspondant au dépôt de  $5 \cdot 10^5$  cellules/puits. Les cellules sont incubées pendant 20 heures avec les solutions d'activation.

Lors de la révélation, les cellules sont lysées avec 100  $\mu$ L de PBS Tween 01% pendant 10 minutes à 4°C. Après trois rinçages, l'anticorps de détection du kit est incubé pendant 1h30 à 37°C dans les puits. Après ajout des solutions de révélations, des spots violets correspondant au point d'émission d'IFN gamma sont visibles. Le nombre exact de spot dans chaque puits est alors déterminé à l'aide du logiciel ELISPOT 3.2.3.

### b) Recherche de peptides immunodominants

Une librairie de séquences peptidiques chevauchantes de l'AFP murine a été produite par la société Thinkpeptides (<http://thinkpeptides.com/>) dans le but de rechercher les peptides présentés lors d'une immunisation avec des MVA recombinants exprimant l'AFP. Chaque peptide synthétisé a une taille de 15 acides aminés et recouvrent sur 11 acides aminés le peptide précédent (**figure 55**). Ainsi, pour la protéine de l'AFP murine, la librairie générée contient 149 peptides.

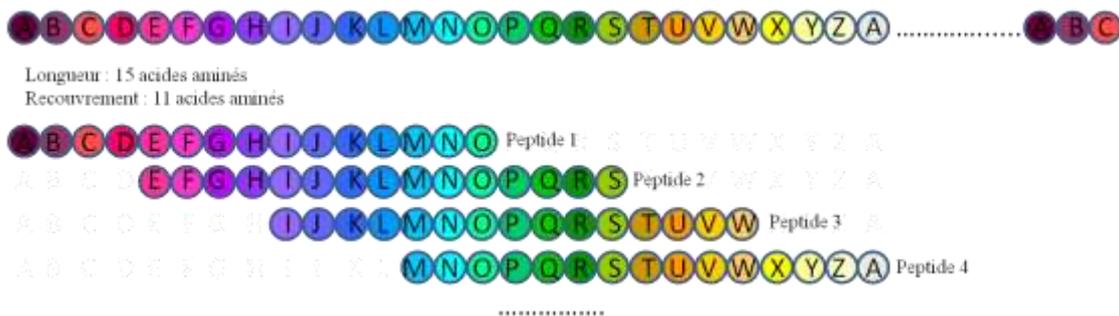


Figure 55 : Représentation schématique de la librairie de peptides générée pour l'AFP murine.

La recherche dans la librairie des peptides présentés par les MVA est faite par des tests Elispot. Dans un premier temps, les peptides sont regroupés en pools de manière à isoler rapidement les peptides capables de générer les plus fortes réponses IFN gamma. Des pools de 12 ou 13 peptides ont été utilisés. Les 25 pools ainsi constitués sont présentés dans la figure 55.

POOLS	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
5	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
6	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
7	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
8	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
9	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
10	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
11	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
12	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
13	145	146	147	148	149							

Pools                      Peptides individuels

Figure 56 : Représentation schématique des pools de peptides constitués.

Les tests Elispot sont réalisés suivant le protocole décrit précédemment. Les cellules sont restimulées avec 1 µg/mL final de peptides. Dans un deuxième temps, les pools ayant engendrés une réponse IFN gamma sont retenus et les peptides individuels susceptibles d'être responsables sont déterminés à l'aide de la matrice présentée en **figure 56**. De nouveaux tests Elispot sont alors réalisés en restimulant les cellules avec 1 µg/mL du peptide individuel à tester.

### *c) Analyse par tétramères*

Un essai de mise en évidence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'AFP par tétramères dans le fond génétique H-2K(k) a été réalisé. Un tétramère couplé PE pour la séquence NEFGIASTL de l'AFP murine a été produit par le NIH (NIH Tetramer Core Facility, Emory University, Atlanta, USA). Les splénocytes utilisés pour le marquage sont obtenus selon le protocole décrit dans le paragraphe « Elispot ». Pour chaque condition, 2.10<sup>6</sup> cellules sont utilisées. Le marquage tétramère est réalisé pendant 30 minutes à température ambiante en reprenant le culot cellulaire avec le tétramère dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans 50 µL de PBS BSA 0.1%. Les cellules sont ensuite lavées avec 1 mL de PBS BSA 0.1% et centrifugées pendant 3 minutes à 400 g. Les cellules sont reprises dans 100 µL de PBS BSA 0.1% contenant un anticorps anti-CD8 couplé au fluorochrome APC et dilué au 1/30<sup>ème</sup> (réf. 130-091-606, Myltenyi Biotec). L'incubation avec ce second anticorps a lieu pendant 10 minutes à 4°C à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois avec 100 µL de PBS BSA 0.1%, reprises dans 500 µL de PBS BSA 0.1% et analysées au cytomètre en flux (BD LSRII). Des conditions (cellules non marquées, cellules marquées uniquement avec l'anticorps anti-CD8) servent de contrôles.

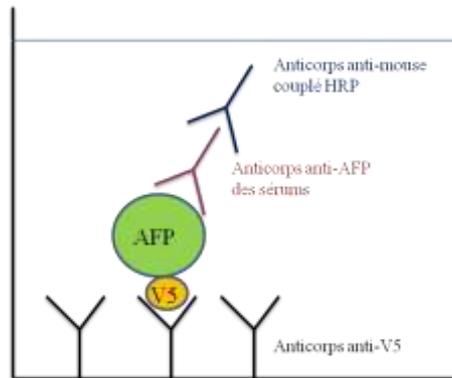
## **3. Analyse de la réponse humorale**

### *a) Prélèvement sanguin*

Au cours des protocoles d'immunisations, des prélèvements sanguins rétro-orbitaux sont réalisés hebdomadairement. Avant le sacrifice, le sang des animaux est récupéré lors d'un prélèvement intracardiaque réalisé avec une aiguille de 26 gauges. Le sang prélevé est centrifugé pendant 5 minutes à 13800 g et le sérum est récupéré puis conservé à -80°C.

*b) Elisa*

Un test Elisa a été mis au point au laboratoire pour détecter les anticorps dirigés contre l'AFP murine. Ne disposant pas de la protéine purifiée de l'AFP, le test mis au point est quelque peu atypique. La **figure 57** représente schématiquement les différentes étapes du test.



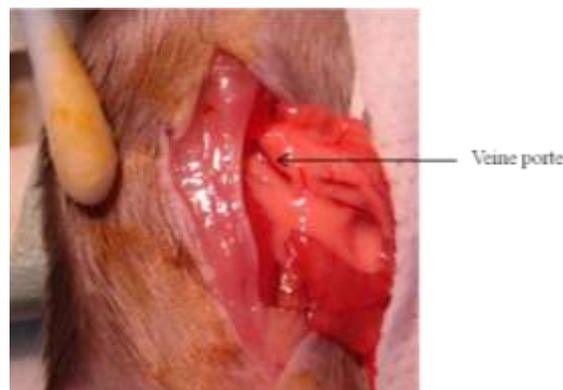
**Figure 57 : Représentation schématique du test Elisa élaboré pour détecter la présence d'anticorps anti-AFP.**

Une plaque 96 puits à fond plat est mise à adhérer sous agitation sur la nuit à 4°C avec 50 µL d'anticorps anti-V5 (référence ab9137, Abcam, Cambridge, UK) à 1 µg/mL dans du tampon bicarbonate 50 mM. Après trois lavages en PBS Tween 20 0,05%, la plaque est saturée avec 150 µL de tampon de saturation (PBS Tween 20 0,05% lait 5%) pendant 1 heure à température ambiante. Une protéine AFP avec un tag V5 a été produite et récupérée dans le surnageant de cellules 293T transfectées. Après lavages, 100 µL de ce surnageant de culture sont déposés et incubés sur la nuit à 4°C. Le lendemain, après trois lavages, 50 µL des échantillons de sérums sont déposés purs ou dilués dans du tampon de dilution (PBS Tween 20 0,05% lait 5%) et incubés sur la nuit à 4°C. Un contrôle positif est réalisé en incubant dans le puits un anticorps anti-V5 (réf. R96025, Invitrogen). Après trois lavages, 100 µL de l'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-souris couplé HRP (réf. P0447, Dakocytomation) dilué au 1/3000<sup>ème</sup> est incubé pendant 2 heures à température ambiante. Après trois lavages, 100 µL de tampon de révélation (5mL de tampon ABTS, 50 mg d'ABTS, H<sub>2</sub>O, Roche) sont déposés par puits. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 405 nm après 1 heure. Un contrôle négatif est réalisé en incubant du surnageant de cellules 293T transfectées avec un plasmide codant pour une protéine GFP taggée V5.

#### 4. Analyse de l'effet thérapeutique

##### a) Protocole dans le modèle orthotopique

L'effet thérapeutique d'une immunisation AFP est étudié dans un modèle orthotopique mis en place dans des souris mâles de 8 semaines de la souche C57BL/6J. Celui-ci est obtenu après injection dans la veine porte de  $2.10^6$  de cellules tumorales hépatiques Hepa 1-6. Le jour de la chirurgie, les cellules sont récoltées à 70% de confluence, lavées et reprises dans du milieu DMEM non complémenté (Gibco, Invitrogen). Après ouverture de la cavité abdominale, les organes sont sortis dans de la gaze pour dégager la veine porte (**figure 58**). Une seringue insulinique de 30 gauges est utilisée pour injecter les 100  $\mu$ L de suspension cellulaire contenant les  $2.10^6$  de cellules. Après injection, une gaze stérile est laissée au point d'injection pour favoriser la coagulation.



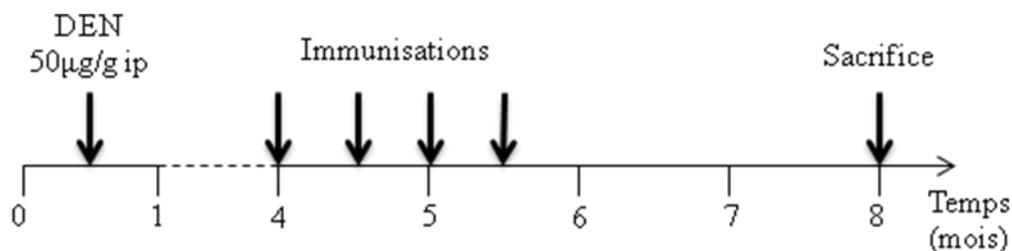
**Figure 58 : Vue de la veine porte dégagée pour réaliser une injection intraportale de cellules tumorales.**

Dans le protocole de prime-boost utilisé, les souris sont immunisées avec le MVA codant pour l'AFP murine transmembranaire ( $5.10^7$  pfu/souris, injection sous cutanée) au jour 0 et immunisées avec un adénovirus codant pour l'AFP murine ( $1.10^9$  pi/souris, intramusculaire) au jour 14. Le challenge tumoral est fait au jour 21 et les animaux sont sacrifiés au jour 42. Au moment du sacrifice, l'évaluation de l'effet thérapeutique est faite à partir de la comparaison du ratio poids total/poids du foie. Le ratio d'un animal sain est de 5.

*b) Protocole dans le modèle chimiquement induit*

Des souris femelles de souche C57BL/6J et des mâles de souche C3H/HeN provenant de l'élevage Janvier sont utilisés pour réaliser des croisements. Les mâles F1 issus de ce croisement reçoivent à 15 jours de vie de la DEN (DiEthylNitrosamine) à 50 µg/g par injection intrapéritonéale dans du PBS.

Les protocoles d'immunisation testés dans ce modèle sont présentés dans la **figure 59**. Quatre immunisations à 2 semaines d'intervalle sont réalisées à partir de l'âge de 4 mois. Les immunisations de MVA correspondent à des injections par voie sous cutanée de  $5.10^7$  pfu dans 100 µL. Les immunisations d'adénovirus correspondent à l'injection par voie intramusculaire dans les deux tibias antérieurs (2 x 25 µL) de  $1.10^9$  particules infectieuses.



groupe	immunisation 1	immunisation 2	immunisation 3	immunisation 4
MVA	MV AmAFP:TMR	MV AmAFP:TMR	MV AmAFP:TMR	MV AmAFP:TMR
MVA-Ad	MV AmAFP:TMR	MV AmAFP:TMR	AdmAFP	/
Ad	/	/	AdmAFP	/
Ad-MVA	AdmAFP	/	MV AmAFP:TMR	MV AmAFP:TMR
PBS	/	/	/	/

**Figure 59 : Protocole d'immunisation sur le modèle DEN.**

Les souris sont sacrifiées à l'âge de 8 mois pour une analyse de l'effet thérapeutique. Elles sont pesées. Les foies sont prélevés et pesés. Les nodules tumoraux sont comptés et leur taille est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

## D. Suivi de la biodistribution *in vivo*

### 1. Marquage colorimétrique

Des souris de 8 semaines de souche C57BL/6J sont immunisées avec  $5.10^7$  pfu de MVA codant pour la  $\beta$ -galactosidase par voie intramusculaire (muscles antérieurs du tibia) ou par voie intrapéritonéale. Les animaux sont sacrifiés 4h, 8h ou 24 heures après l'injection. Les organes d'intérêt (foie, poumons, reins, muscles) sont prélevés et rincés avec du PBS. Ils sont ensuite fixés pendant 30 minutes dans une solution de paraformaldéhyde 2% puis rincés au PBS. Les organes sont ensuite incubés pendant 4 heures minimum dans une solution de PBS contenant 10  $\mu$ g/mL X-gal, 200 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 200 mM  $K_4Fe(CN)_6$  et 10 mM  $MgCl_2$ .

### 2. Imagerie SPECT-CT

Des souris mâles de 8 semaines de souche C57BL/6J sont immunisées avec  $5.10^7$  pfu de MVA hNIS par voie intramusculaire (muscles antérieurs du tibia) ou par voie intrapéritonéale ou par voie intraveineuse (veine de la queue). Les animaux reçoivent 4 heures, 16 heures ou 24 heures après l'injection virale, une dose de 100 MBq de  $^{99m}Tc$ -pertechnetate par voie intrapéritonéale. Après dix minutes, les animaux sont endormis avec de l'isoflurane 3% et l'incorporation de technétium est visualisée à l'aide d'un SPECT (eXplore speCZT CT 120, GE Healthcare). Le rythme cardiaque des animaux est suivi pendant toute la durée de l'expérience. Une acquisition de 30 minutes est réalisée avec une résolution de 50 microns. Les animaux sont soumis à des pulses de 20 millisecondes de rayons X. Les images sont reconstruites à l'aide du logiciel associé au SPECT.

# Résultats

## IV. Résultats des travaux

### A. Productions des MVA recombinants

#### 1. Bilan des MVA recombinant produits

A chaque étape (stock GPT<sup>+</sup>, GPT<sup>-</sup>, stock purifié) de la production virale, un contrôle par séquençage a été réalisé afin de s'assurer qu'aucune mutation ne soit survenue dans la séquence du transgène. Les vérifications faites par PCR ont permis de sélectionner les vecteurs recombinants et de, progressivement, constituer un stock viral dépourvu de tout virus parental. Les différents stocks viraux sont titrés aux différentes étapes de la production (tableau 21).

Virus	Titre stock GPT <sup>+</sup>	Titre stock GPT <sup>-</sup>	Titre stock purifié
MVA parental	-	-	2.10 <sup>9</sup> pfu/mL
MVA mAFP	2,8 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	5,6 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	8,4.10 <sup>8</sup> pfu/mL
MVA dSP mAFP	4 .10 <sup>5</sup> pfu/mL	5 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	9.10 <sup>8</sup> pfu/mL
MVA mAFP:TMR	2,6 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	7,4 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	1,5.10 <sup>9</sup> pfu/mL
MVA hAFP	7,2 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	6,5.10 <sup>6</sup> pfu/mL	3,8.10 <sup>9</sup> pfu/mL
MVA hNIS	1,4 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	3 .10 <sup>6</sup> pfu/mL	3,4.10 <sup>8</sup> pfu/mL

**Tableau 21 : Titres viraux des MVA recombinants produits aux différentes étapes de production.**

En fonction de l'insert, le rendement de la production peut différer. Le titre est évalué en nombre de particules virales, présentes dans 1 mL de suspension virale, capables de former une plaque de lyse sur des cellules en culture (pfu : plaque forming unit). Les titres des différents stocks purifiés de MVA produits pour le projet varient entre 10<sup>8</sup> à 10<sup>9</sup> pfu/mL, ce qui est cohérent avec les titres habituellement obtenus avec la technique employée.

#### 2. Contrôle *in vitro* des MVA recombinants

##### a) Contrôle de l'expression protéique par western blot

Après séquençage de l'insert d'intérêt, l'expression protéique des inserts est contrôlée par l'infection de cellules de poulet (CEP) par les MVA recombinants. Cette expression est vérifiée tout au long de la production par la réalisation de western blot successivement sur les

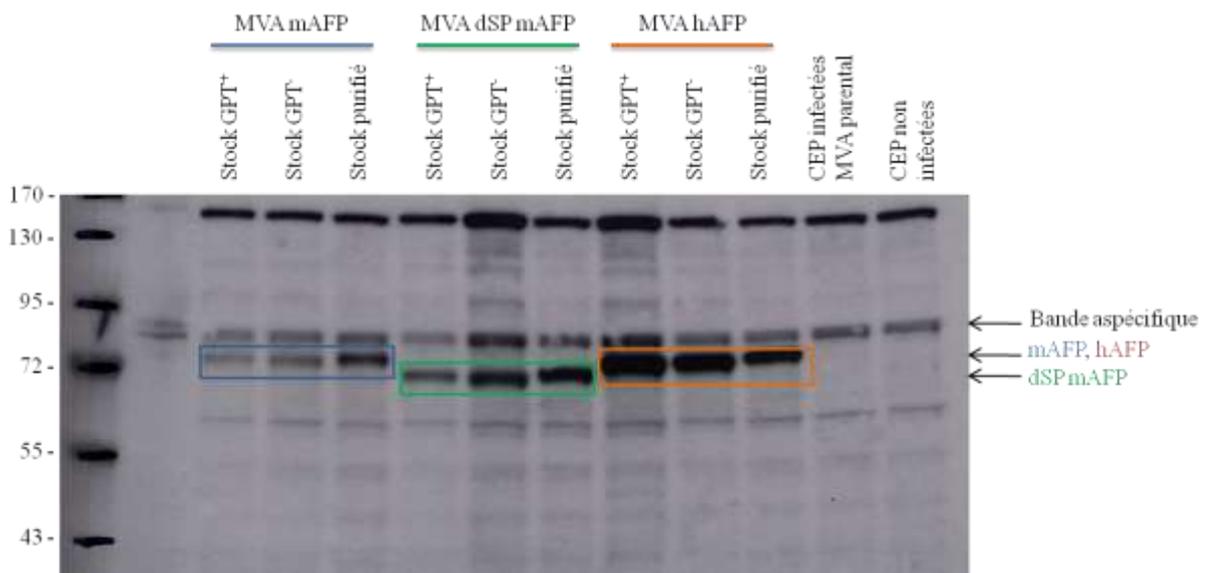
stocks GPT<sup>+</sup>, GPT<sup>-</sup> et sur le stock purifié. Deux conditions, CEP non infectées et CEP infectées par le MVA parental, servent de contrôles négatifs.

Dans le cas des MVA exprimant les différentes formes de l'AFP, l'anticorps primaire utilisé est dirigé contre la partie C-terminale de l'AFP humaine et est également capable de détecter la forme murine de la protéine. Cet anticorps est aussi susceptible de réagir avec l'albumine sérique. Les tailles attendues pour les formes protéiques modifiées de l'AFP murine ont été prédites à l'aide du site ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>) et sont présentées dans le **tableau 22**.

Protéine	Nombre d'acides aminés	Poids moléculaire attendu
mAFP	605	67 kDa
dSP mAFP	588	65 kDa
mAFP:TMR	671	74 kDa
hAFP	609	68 kDa
albumine	607	69 kDa

**Tableau 22 : Poids moléculaires attendus pour les différentes protéines recherchées.**

L'ensemble des contrôles protéiques effectués au cours de la production virale des MVA recombinants mAFP, dSP mAFP et hAFP est présenté dans la **figure 60**.



**Figure 60 : Contrôle par western-blot de l'expression de l'AFP murine sécrétée, intracellulaire et de l'AFP humaine.**

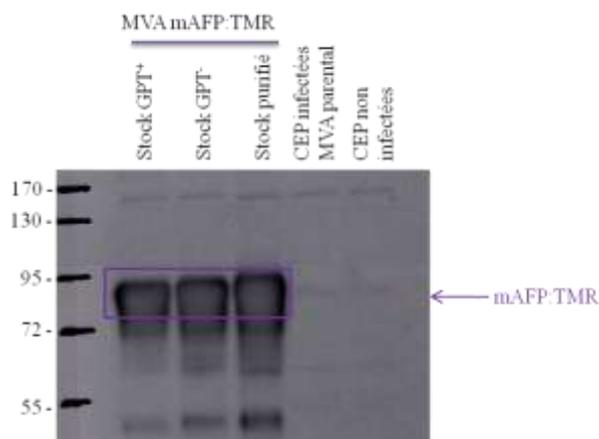
On note que, pour les trois formes d'AFP testées, trois bandes spécifiques sont détectées au cours des trois étapes de la production et que celles-ci sont absentes des deux contrôles négatifs.

De plus, les tailles respectives de ces trois bandes spécifiques sont cohérentes avec les modifications protéiques réalisées : la bande spécifique de la forme intracellulaire est détectée à un plus petit poids moléculaire que la forme native de l'AFP murine. Les protéines natives de l'AFP murine (mAFP) et humaine (hAFP) sont détectées au même poids moléculaire. L'homologie de séquence entre les deux formes est de 65% mais d'un point de vue de la taille, l'AFP humaine ne présente que 4 acides aminés supplémentaires par rapport à l'AFP murine (soit des poids moléculaires de 68 et 67 kDa respectivement).

Cependant, les poids moléculaires observés semblent d'après le marqueur de taille utilisé être plus élevés que les tailles attendues. Cela peut être dû au dépôt d'une quantité importante de protéines pouvant gêner la migration. En effet, avant le dépôt sur gel, aucun dosage protéique n'est réalisé. Cela peut de plus expliquer la différence d'intensité des bandes observée puisque selon le rendement de l'extraction protéique, la quantité de protéines présentes à volume égal va différer.

Une bande aspécifique au dessus des bandes d'intérêt est détectée et ce, également dans les deux contrôles négatifs. Celle-ci pourrait correspondre à l'albumine bovine présente dans le milieu de culture des CEP ainsi que dans certaines étapes de la réalisation du WB. La réaction croisée de l'anticorps primaire avec l'albumine est décrite par le fournisseur.

L'anticorps dirigé contre l'AFP utilisé précédemment n'a pas permis de détecter la forme fusionnée de l'AFP murine avec la région transmembranaire. Une explication probable est justement la localisation de cette fusion. En effet, comme évoqué précédemment, l'anticorps détecte la partie C-terminale de l'AFP or la fusion du domaine transmembranaire est faite à cette extrémité ce qui pourrait rendre inaccessible le site de fixation de l'anticorps. Un anticorps dirigé contre le domaine transmembranaire a alors été utilisé pour mettre en évidence la protéine codée par le MVA mAFP :TMR (**figure 61**).



**Figure 61 : Contrôle par western-blot de l'expression de l'AFP murine transmembranaire.**

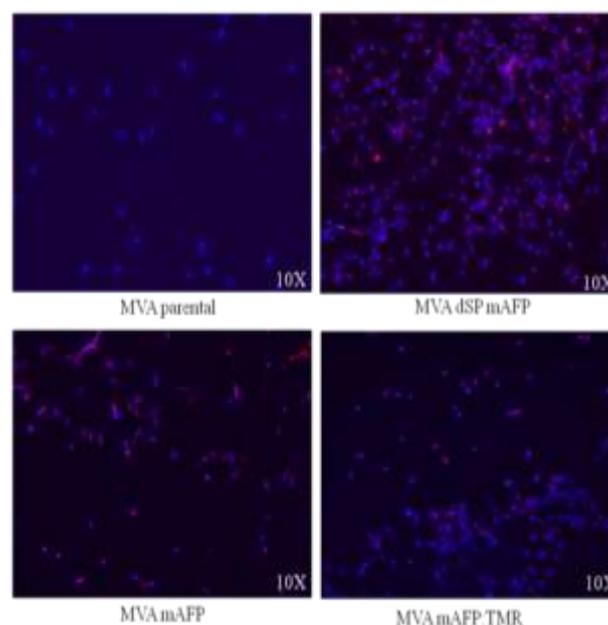
Le poids moléculaire prédit par le logiciel ExPASy pour la protéine mAFP:TMR est de 74 kDa. Une bande spécifique, absente dans les contrôles négatifs, est détectée à un poids moléculaire supérieur à celui des formes native ou intracellulaire.

La vérification par western-blot permet d'indiquer que les transgènes insérés dans les MVA recombinants permettent l'expression des différentes formes protéiques attendues : la forme native sécrétée de l'AFP murine, la forme intracellulaire de l'AFP murine, la forme transmembranaire de l'AFP murine et la forme native sécrétée de l'AFP humaine.

A noter qu'il n'existe pas d'anticorps dirigé contre le symporteur NIS permettant une vérification de l'expression par western blot.

#### *b) Contrôle de l'expression protéique par immunofluorescence*

L'objectif de l'immunofluorescence dirigée contre l'AFP est de distinguer les différentes localisations attendues des protéines modifiées de l'AFP. L'anticorps utilisé est le même que celui utilisé lors des westerns blots. Les cellules permissives de hamster BHK21 sont infectées à une MOI de 1,5 soit avec le virus parental (condition servant de contrôle négatif), soit avec les MVA recombinants exprimant les trois formes de l'AFP murine (**figure 62**).

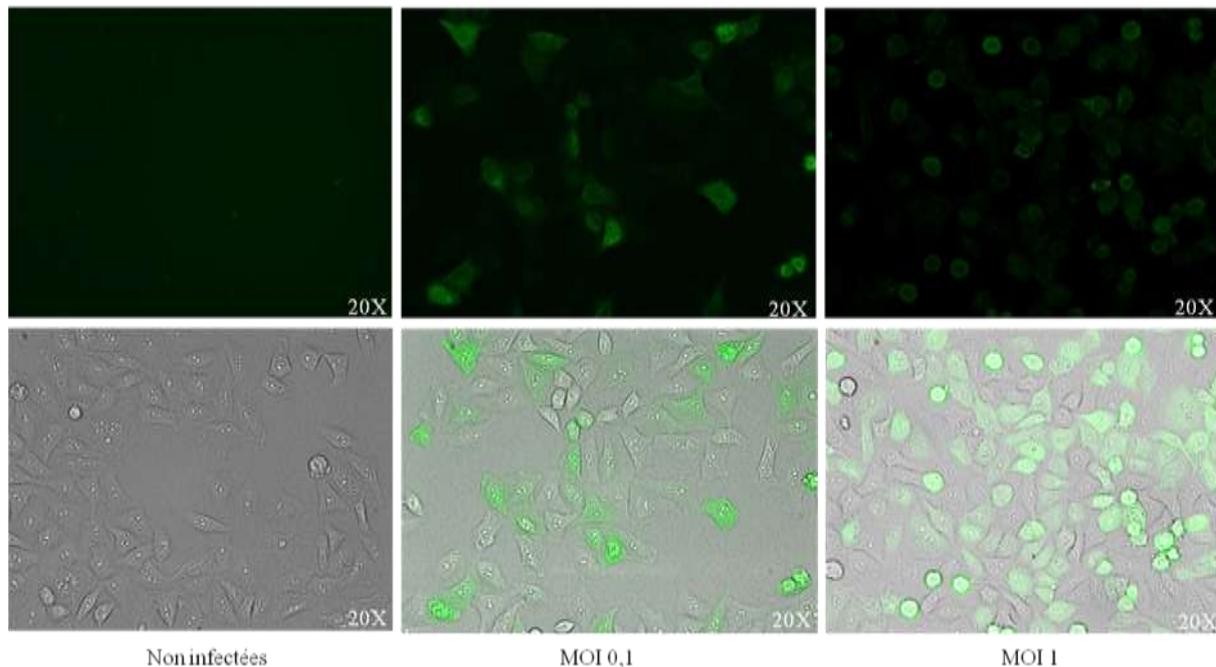


**Figure 62 : Visualisation par immunofluorescence anti-AFP des différentes formes de l'AFP exprimées par les MVA recombinants.**

On peut noter l'absence de marquage dans la condition BHK21 infectées avec le MVA parental comparativement aux trois autres conditions testées. Les conditions d'immunofluorescence utilisées semblent permettre de visualiser la forme sécrétée de l'AFP (condition MVA mAFP), la protéine ne doit pas encore être libérée car le marquage est situé à proximité du noyau. Il est également intéressant de noter que la forme transmembranaire est visualisable alors que ce même anticorps ne permettait pas la détection de la protéine en western blot.

Cependant, les images obtenues, que ce soit au grossissement 10 présenté ou à un plus fort grossissement, ne permettent pas de conclure quant à la localisation des différentes formes protéiques. Il est possible qu'une visualisation au confocal aurait mieux permis de faire cette distinction.

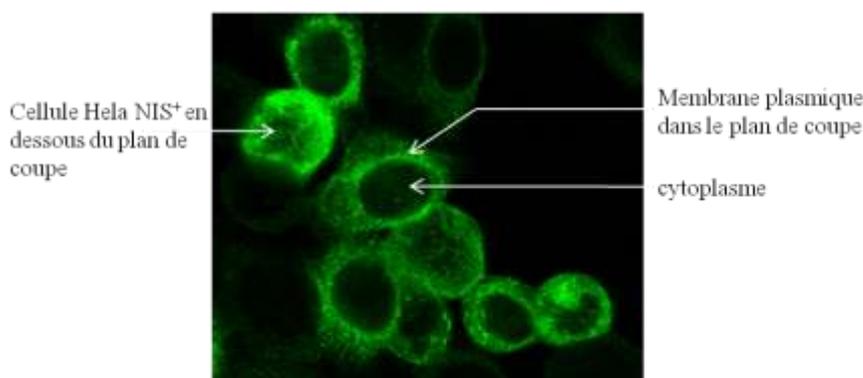
Aucun contrôle par western blot n'ayant pu être réalisé pour l'expression du symporteur NIS, des cellules Hela ont été infectées avec le MVA hNIS à différentes MOI (0,1 et 1). La protéine est détectée 24 heures après infection par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le symporteur (**figure 63**).



**Figure 63 : Immunofluorescence dirigée contre le symporteur NIS dans des cellules Hela infectées par le MVA hNIS.** La partie supérieure de la figure représente la fluorescence seule tandis que la partie inférieure de la figure correspond à une superposition entre la fluorescence et les cellules observées en lumière blanche.

Par comparaison avec des cellules HeLa non infectées, un marquage spécifique est obtenu en condition d'infection par le MVA hNIS. Le niveau d'infection observé corrèle avec les MOI utilisées. A une MOI de 1 (soit théoriquement, autant de particules infectieuses que de cellules présentes), la grande majorité des cellules visualisées dans le champ d'observation exprime le symporteur alors que lors de l'infection à MOI 0,1, seule une faible proportion de cellules est positive pour le marquage NIS. Le symporteur est décrit comme ayant une position transmembranaire, cependant des localisations nucléaires et cytoplasmiques ont déjà été rapportées. Le marquage des cellules positives ne semblent pas, sur les images, restreint à la membrane.

La fonctionnalité de NIS est cependant dépendante de sa position transmembranaire pour que le symporteur puisse assurer l'entrée d'iode dans la cellule. Des cellules HeLa infectées par le MVA hNIS ont également été observées au confocal pour s'assurer de la localisation transmembranaire du symporteur. La **figure 64** représente une coupe transversale d'une cellule positive pour l'expression du NIS.



**Figure 64** : Coupe tomographique d'une observation au confocal de cellules HeLa infectées par MVA hNIS et marquées par immunofluorescence anti-NIS.

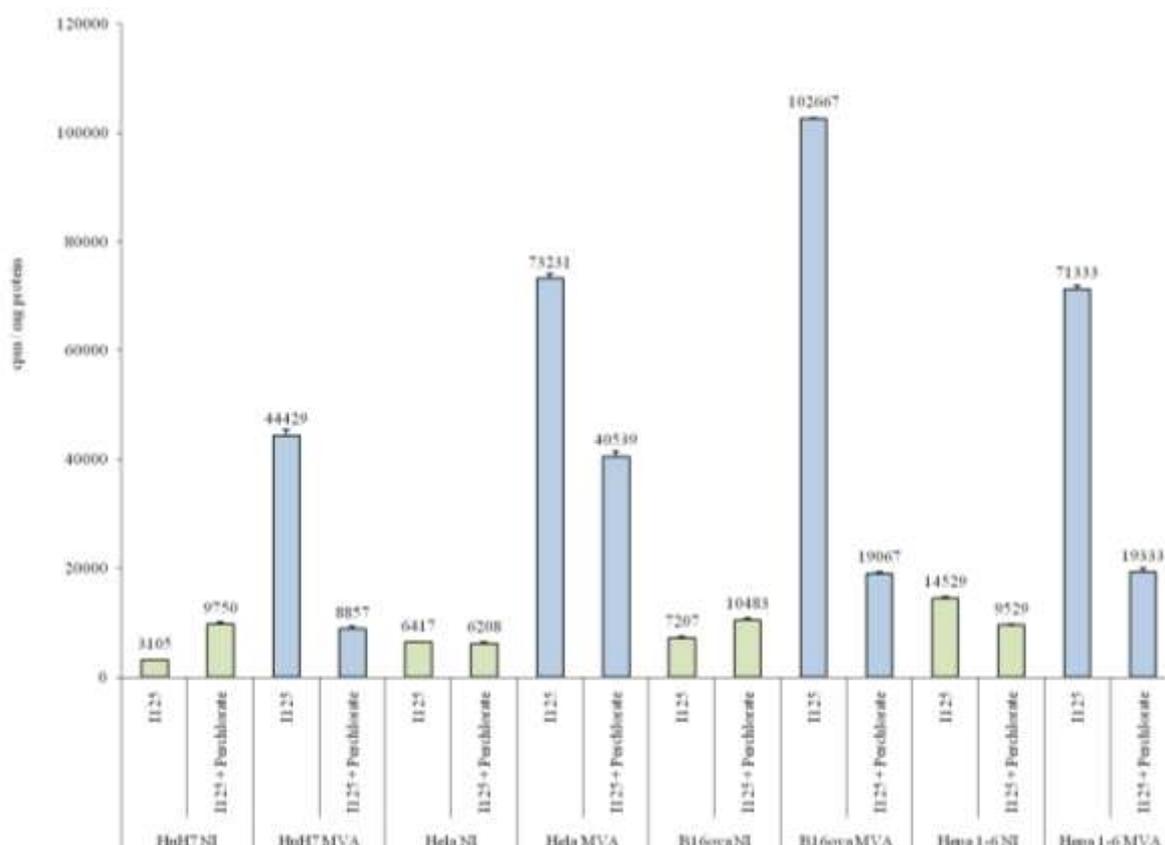
On observe un marquage de la totalité de la membrane pour les cellules situées en dessous du plan de coupe et une absence de marquage au niveau du cytoplasme des cellules partiellement dans le plan de coupe. L'observation en 3D des cellules permet de conclure que le NIS codé par le MVA recombinant est effectivement localisé à la membrane.

### *c) Contrôle de la fonctionnalité de MVA hNIS*

La fonctionnalité du symporteur NIS codé par le MVA recombinant est vérifiée lors d'un test d'incorporation d'iode *in vitro*. Des cellules humaines (lignées hépatique HuH7 et

utérine Hela) et murines (lignées hépatique Hepa 1-6 et de mélanome B16-OVA) sont infectées par le MVA hNIS ou ne sont pas infectées (NI, condition contrôle).

L'ajout d'iode  $^{125}\text{I}$  dans le milieu a pour but de déterminer la capacité d'incorporation des cellules via le symporteur NIS. De façon à s'assurer que cette incorporation est spécifique, une condition avec ajout d'un inhibiteur, le perchlorate de sodium, est réalisée. La **figure 65** représente la quantité d'iode radioactif incorporée en coups par minute (cpm) par milligramme de protéines dans les différentes conditions testées.



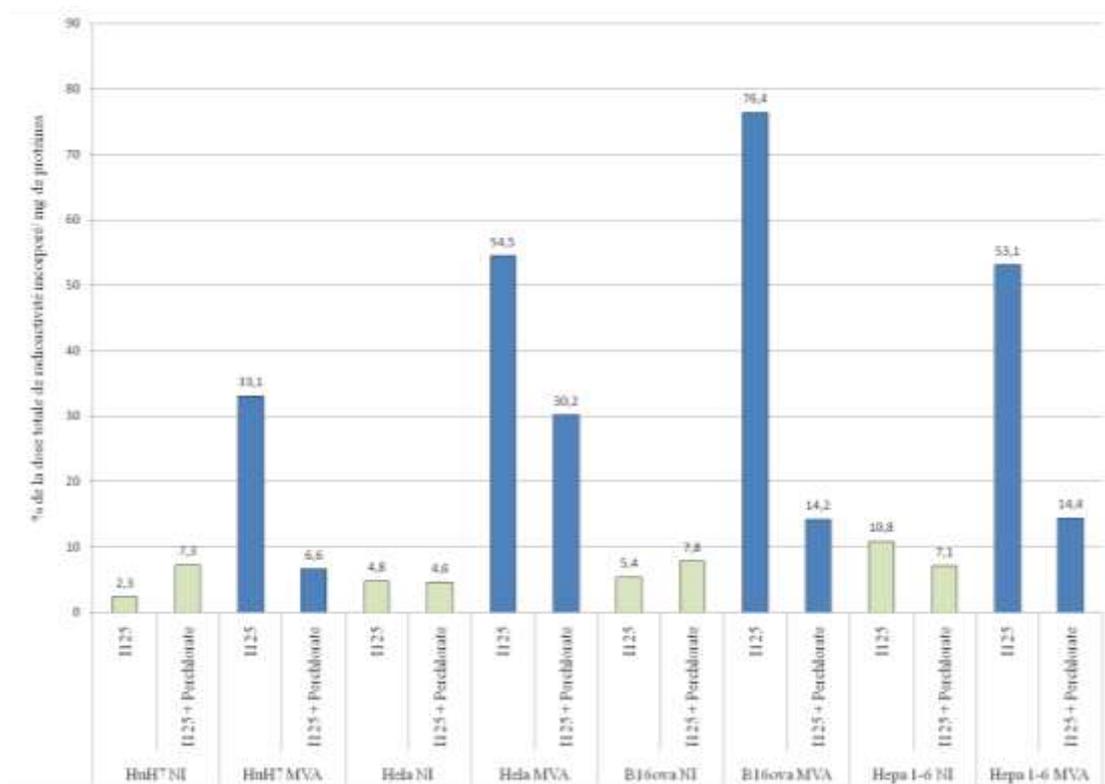
**Figure 65 : Incorporation d'iode *in vitro* par différents types cellulaires infectés par le MVA hNIS.** Les cellules sont infectées (MVAhNIS) ou non (NI) par le vecteur MVA recombinant exprimant hNIS.

Quelque soit le type des cellules, lorsque celles-ci ne sont pas infectées (NI), l'entrée d'iode atteint un niveau basal d'une moyenne de 7814 cpm/mg de protéines. Ce niveau basal n'est pas significativement affecté par l'ajout de perchlorate de sodium (moyenne de 8992 cpm/mg de protéines).

L'infection par le MVA hNIS conduit à une entrée d'iode entre 5 et 13 fois supérieure au niveau basal selon le type cellulaire. Cette incorporation est spécifiquement due à

l'expression de NIS puisque l'ajout du perchlorate de sodium réduit d'un facteur 2 à 5 l'entrée d'iode.

Pour quantifier l'incorporation d'iode dans les cellules, la radioactivité comptée est rapportée à la dose totale de radioactivité disponible (**figure 66**).



**Figure 66 : Pourcentage d'incorporation de la dose totale de radioactivité après infection par le MVA hNIS de différents types cellulaires.**

Environ 6% de l'incorporation d'iode n'est pas lié à la présence de NIS (condition NI avec ou sans perchlorate). En fonction des types cellulaires, bien qu'il existe des disparités, l'expression de NIS permet d'incorporer une grande quantité d'iode puisqu'entre 33 et 76 % de la quantité totale d'iode radioactif présente est captée par les cellules.

Une capacité variable d'infectabilité par le MVA peut expliquer les différences de niveau d'incorporation entre les types cellulaires. Cependant, chaque type cellulaire testé est capable d'exprimer le symporteur NIS à sa membrane et ainsi d'incorporer de l'iode après infection par le MVA hNIS.

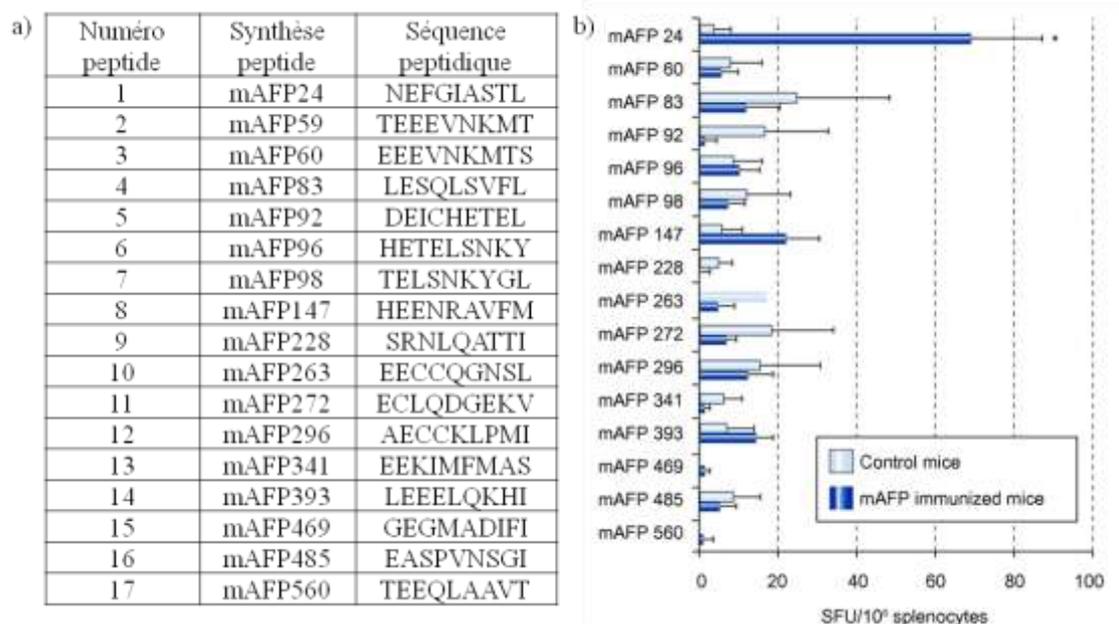
## B. Analyse de la réponse cellulaire

### 1. Analyse de la réponse spécifique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> contre un épitope immunodominant décrit par algorithme

#### a) Résultats antérieurs du laboratoire

Alors que 4 peptides immunodominants ont été décrits pour l'AFP humaine, aucun n'a été décrit pour l'AFP murine et l'homologie entre les formes humaine et murine n'est que de 65%. Des précédents travaux réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence un peptide immunodominant de l'AFP murine prédit à l'aide d'algorithmes. Les critères utilisés pour la prédiction sont l'affinité de liaison entre le peptide et le complexe CMH-I.

Brièvement, des souris de souche C3H/HeN (fond H2K-k) ont été immunisées par voie intramusculaire avec un adénovirus codant pour la forme native murine de l'AFP ou du PBS (groupe contrôle). Les rates sont prélevées 3 semaines après immunisation et un test Elispot IFN gamma est réalisé en restimulant avec chacun des peptides prédits. Les peptides testés et les résultats du test Elispot est présenté dans la **figure 67**.

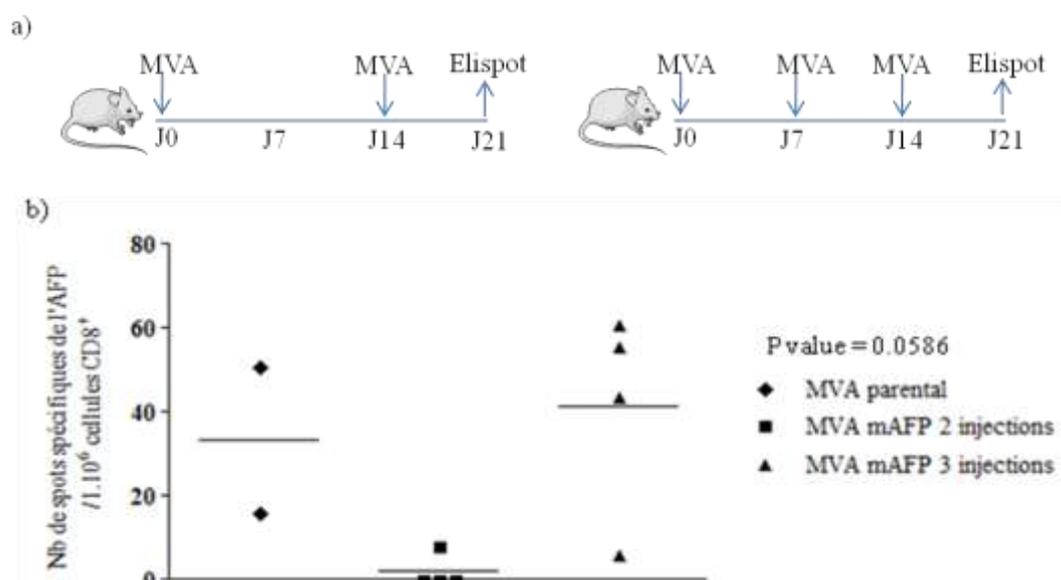


**Figure 67 : Recherche d'un peptide immunodominant de l'AFP murine.** a) Liste des peptides immunodominants prédits par algorithme. b) Test Elispot utilisant les peptides prédits pour restimuler les splénocytes. (Cany et al., 2010).

Le peptide mAFP24, noté par la suite peptide 1, permet d'obtenir la plus forte réponse IFN gamma spécifique après restimulation de splénocytes de souris C3H/HeN immunisées avec un adénovirus codant pour l'AFP murine.

### b) Comparaison du nombre d'injections

Dans un premier temps, le meilleur protocole de vaccination a été recherché. Des souris de souche C3H/HeN ont été immunisées 2 ou 3 fois par voie sous cutanée à deux semaines d'intervalle aux jours 0 et 14 (protocole à 2 injections) ou aux jours 0, 7 et 14 (protocole à 3 injections) avec le MVA mAFP à  $5.10^7$  pfu par injection. Un Elispot est réalisé au jour 21 en restimulant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec le peptide 1 de l'AFP (**figure 68**). Un contrôle négatif est réalisé en injectant le MVA parental selon le protocole à 3 injections. Les groupes immunisés avec le MVA recombinant sont composés de 4 animaux et le groupe contrôle négatif de 2 animaux.

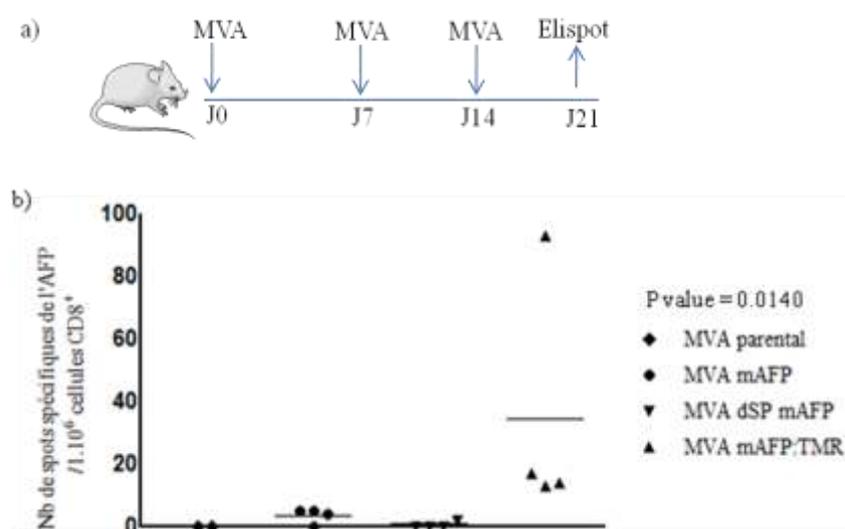


**Figure 68 : Comparaison de la réponse immunitaire obtenue en test Elispot en fonction du nombre d'immunisations.** a) Protocole d'immunisations à 2 ou 3 injections. b) Réponse AFP spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis.

Le protocole à 2 injections ne permet de détecter qu'une réponse IFN gamma très faible. La réponse des deux animaux immunisés avec le MVA parental est variable mais non nulle. Concernant le groupe injecté 3 fois, 3 souris sur 4 répondent de façon plus importante avec environ 50 spots par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Bien que la comparaison des trois groupes entre eux ne soit pas statistiquement significative, le niveau de réponse immunitaire détecté est plus important lors du protocole à 3 injections et celui-ci sera donc utilisé pour le reste des expérimentations.

c) *Comparaison des MVA recombinants exprimant l'AFP murine*

Des souris de souche C3H/HeN ont été immunisées 3 fois par voie sous cutanée à une semaine d'intervalle aux jours 0, 7 et 14 avec les différents MVA recombinant exprimant l'AFP murine (forme native mAFP, intracellulaire dSP mAFP, transmembranaire mAFP:TMR) à  $5.10^7$  pfu par injection. Un Elispot est réalisé au jour 21 en restimulant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec le peptide 1 de l'AFP (**figure 69**). Un contrôle négatif est réalisé en injectant le MVA parental selon le protocole à 3 injections. Les groupes immunisés avec le MVA recombinant sont composés de 4 animaux et le groupe contrôle négatif de 2 animaux.



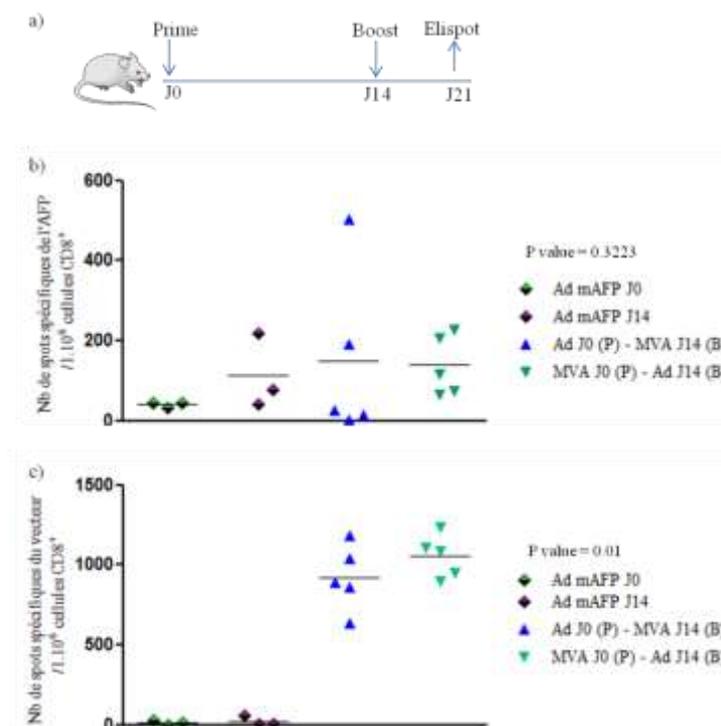
**Figure 69 :** Comparaison de la réponse immunitaire obtenue en test Elispot en fonction du MVA recombinant utilisé. a) Protocole d'immunisations à 3 injections. b) Réponse AFP spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis.

Aucune réponse ou des réponses très faibles (inférieures à 5 spots par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>) sont obtenues dans le cas des immunisations avec le vecteur parental, le vecteur exprimant la forme native mAFP ou le vecteur exprimant la forme intracellulaire dSP mAFP. Pour le groupe immunisé avec la forme transmembranaire, trois souris présentent une réponse de l'ordre de 15 spots par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, ce qui est relativement faible et une seule souris répond fortement (92 spots). Une immunisation avec la forme transmembranaire semble donc plus propice à déclencher chez les souris vaccinées une réponse immunitaire de type CD8<sup>+</sup>. Le MVA mAFP:TMR sera donc utilisé pour la suite des expériences.

*d) Combinaison avec l'adénovirus dans un protocole de prime-boost*

Le niveau de réponse obtenu lors d'une triple immunisation à  $5.10^7$  pfu par injection avec le MVA mAFP:TMR reste faible. L'objectif a alors été d'améliorer le protocole de vaccination pour déclencher chez les animaux immunisés une réponse plus nette. Dans ce but, la première approche a été de réaliser un protocole de vaccination par prime-boost avec le MVA et un adénovirus codant pour l'AFP murine.

Des groupes de 5 animaux de souche C3H/HeN ont été constitués : une première immunisation (prime) a été réalisée au jour 0 suivie d'une seconde immunisation (boost) réalisée au jour 14. L'adénovirus (Ad mAFP) est injecté à  $1.10^9$  particules infectieuses par voie intramusculaire. Le MVA (MVA mAFP:TMR) est injecté à  $5.10^7$  pfu par voie sous cutanée. Deux groupes contrôles (3 animaux/groupe) permettent de voir l'effet de l'injection adénovirale seule au jour 0 ou au jour 14 (**figure 70 a**). Un Elispot est réalisé au jour 21 en restimulant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec le peptide 1 de l'AFP (**figure 70 b**) ou avec le MVA parental (**figure 70 c**).



**Figure 70 : Effet d'un protocole de prime boost sur la réponse immunitaire spécifique de l'AFP.** a) Protocole d'immunisations par prime boost. b) Réponse AFP spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis. c) Réponse MVA spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis.

Concernant la réponse spécifique de l'AFP, l'immunisation avec l'adénovirus injecté 7 jours avant le sacrifice induit un niveau de réponse plus élevée (moyenne de 112 spots) que lorsque l'injection a lieu 14 jours avant le sacrifice (moyenne de 40 spots).

Les deux protocoles de prime boost testés donnent approximativement le même niveau moyen de réponse (environ 140 spots) ainsi il ne semble pas y avoir d'ordre à privilégier entre les immunisations adénovirale et poxvirale. Une analyse plus fine indique que lorsque les animaux sont immunisés d'abord par l'adénovirus puis par le MVA, 1 animal déclenche une forte réponse spécifique de l'AFP (504 spots) alors que 3 animaux montrent une réponse immunitaire beaucoup plus mesurée entre 65 et 115 spots.

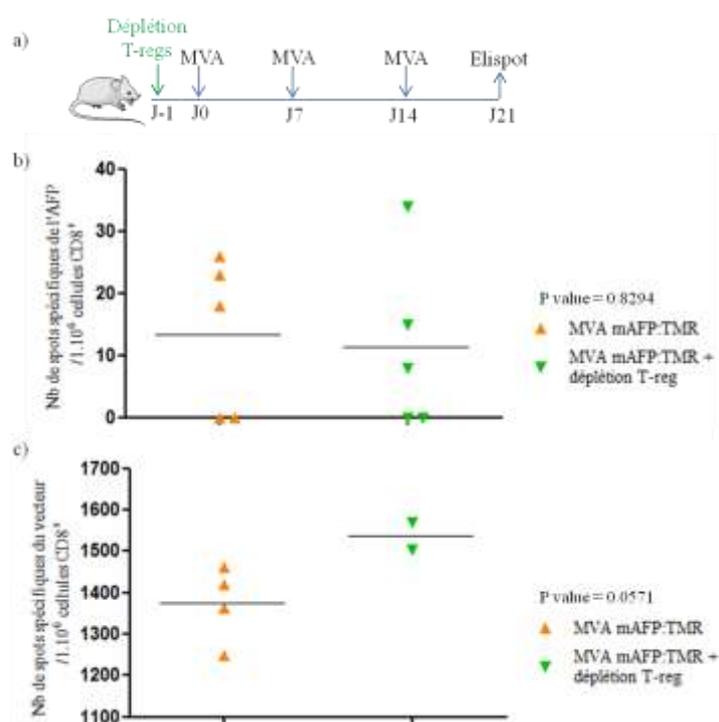
La comparaison du groupe « AdmAFP J0 » et du groupe « AdmAFP J0 + MVA mAFP :TMR J14 » montre que pour 2 animaux sur 5, le boost avec une immunisation MVA augmente le niveau de réponse spécifique contre l'AFP. Cependant, la comparaison du groupe « AdmAFP J14 » et du groupe « MVA mAFP :TMR J0 + AdmAFP J14 » indique qu'il n'y a pas d'effet additif dû à l'injection de MVA sur la réponse immunitaire observée. Ainsi, les niveaux de réponse plus élevés observés dans cette expérience comparativement au niveau obtenu lors d'immunisations avec le seul vecteur MVA semblent s'expliquer principalement par l'injection d'adénovirus codant pour l'AFP.

Un elispot avec les splénocytes de ces mêmes animaux a été réalisé en restimulant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec le vecteur parental de manière à évaluer la réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre le vecteur d'immunisation. Comme attendu, les souris des groupes immunisés seulement avec le vecteur adénoviral ne présentent pas de réponse immunitaire contre le MVA. Les 10 souris des groupes « prime-boost » ont des lymphocytes spécifiques du vecteur MVA et quelque soit le moment de l'injection poxvirale, ce niveau de réponse contre le vecteur est similaire autour de 1000 spots. Il est ainsi intéressant de noter la variabilité de réponse contre l'AFP observée chez ces mêmes souris alors qu'elles semblent réagir immunitairement de la même façon à la présence du vecteur MVA.

#### *e) Déplétion de lymphocytes T régulateurs*

Une autre approche utilisée pour augmenter la réponse immunitaire déclenchée suite à une immunisation MVA AFP a été de déléter les lymphocytes T régulateurs. Pour cela, une déplétion des cellules CD25<sup>+</sup> a été faite avant de démarrer le protocole d'immunisation.

Deux groupes de 5 animaux de souche C3H/HeN ont été immunisés suivant un protocole classique (3 injections MVA à 7 jours d'intervalle de  $5.10^7$  pfu par voie sous cutanée) avec ou sans déplétion CD25 préalable (**figure 71 a**). Un Elispot est réalisé au jour 21 en restimulant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec le peptide 1 de l'AFP (**figure 71 b**) ou avec le MVA parental (**figure 71 c**).



**Figure 71 : Effet d'une déplétion en lymphocytes T régulateurs sur la réponse immunitaire obtenue en test Elispot.** a) Protocole d'immunisation. b) Réponse AFP spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis. c) Réponse MVA spécifique obtenue lors d'un test Elispot IFN gamma. Test statistique Kruskal-Wallis.

Dans les deux groupes, le niveau moyen de spots spécifiques de l'AFP obtenu est faible de l'ordre de 12 spots par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans chaque groupe, 2 souris sur 5 ne répondent pas du tout à la restimulation par le peptide 1 de l'AFP. Pour les 3 souris restantes dans chacun des groupes, on n'observe pas d'effet favorable de la déplétion en lymphocytes T régulateurs sur la présence de lymphocytes T spécifiques de l'AFP puisque la moyenne de spots obtenue est de 22 sans et 19 avec déplétion.

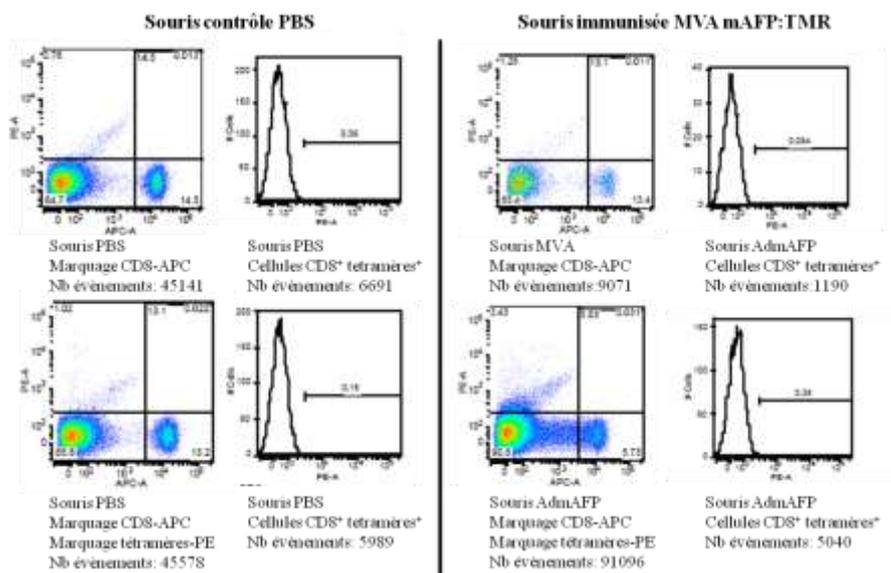
Lorsque l'on compare la présence de lymphocytes spécifiquement dirigés contre le vecteur, il est intéressant de noter que la réponse immunitaire contre le vecteur est plus forte lorsque les lymphocytes T régulateurs sont déplétés. Les moyennes du nombre de spots par millions de CD8<sup>+</sup> sont de 1373 et 1537 respectivement pour les conditions sans et avec

déplétion et ce alors que pour 3 souris sur 5 dans le groupe déplétion, le seuil de saturation de l'appareil de comptage a été atteint.

Pour conclure, la réponse immunitaire limitée contre l'AFP ne semble pas être dû à un effet inhibiteur des lymphocytes T régulateurs.

*f) Recherche de la population lymphocytaire spécifique de l'AFP par tétramères*

Une recherche de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide 1 de l'AFP a également été faite lors d'un marquage tétramère. Les splénocytes de souris immunisées (3 injections de 5.10<sup>7</sup> pfu de MVA mAFP :TMR à 7 jours d'intervalle) ou non (souris ayant reçues du PBS) sont récoltés au jour 21. Pour chaque condition, 2.10<sup>6</sup> splénocytes sont marqués soit uniquement avec un anticorps anti-CD8, soit doublement marqués avec l'anticorps anti-CD8 et le tétramère spécifique du peptide 1 de l'AFP. Une analyse par cytomètre en flux permet de détecter la population doublement marquée correspondant aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la séquence peptidique NEFGIASTL (**figure 72**).



Condition	Marquage tétramère spécifique
Souris PBS	0.09
Souris MVA mAFP:TMR 1	0.025
Souris MVA mAFP:TMR 2	-0.35
Souris MVA mAFP:TMR 3	0.296

**Figure 72 : Détection de lymphocytes T spécifiques du peptide 1 de l'AFP par marquage tétramères.**

Une comparaison du pourcentage de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du peptide 1 de l'AFP est faite entre les souris immunisées contre l'AFP ou non immunisées (PBS). Dans le cas de souris C3H/HeN non immunisées, 0,09% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent spécifiquement la séquence du peptide 1 de l'AFP. Sur les 3 souris immunisées avec un vecteur MVA exprimant la forme transmembranaire de l'AFP, seule 1 souris présente un pourcentage plus important (0.296 %) de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques. Les populations détectées sont de toute façon extrêmement faibles, ce qui peut expliquer la grande variabilité observée sur les trois souris immunisées. Il est ainsi difficile de conclure sur la possibilité de mettre en évidence par marquage tétramère des lymphocytes spécifiques et ce même en augmentant le nombre d'animaux dans l'étude ou en réalisant une acquisition d'un très grand nombre de cellules.

## 2. Recherche de peptides immunodominants

L'ensemble des tests Elispot présentés précédemment est réalisé après un tri des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et une restimulation avec le peptide 1 de l'AFP. Pour rappel, ce peptide a été prédit par algorithme et son efficacité a été mise en évidence dans le cadre d'une immunisation avec un adénovirus codant pour l'AFP murine dans un fond H2K-k.

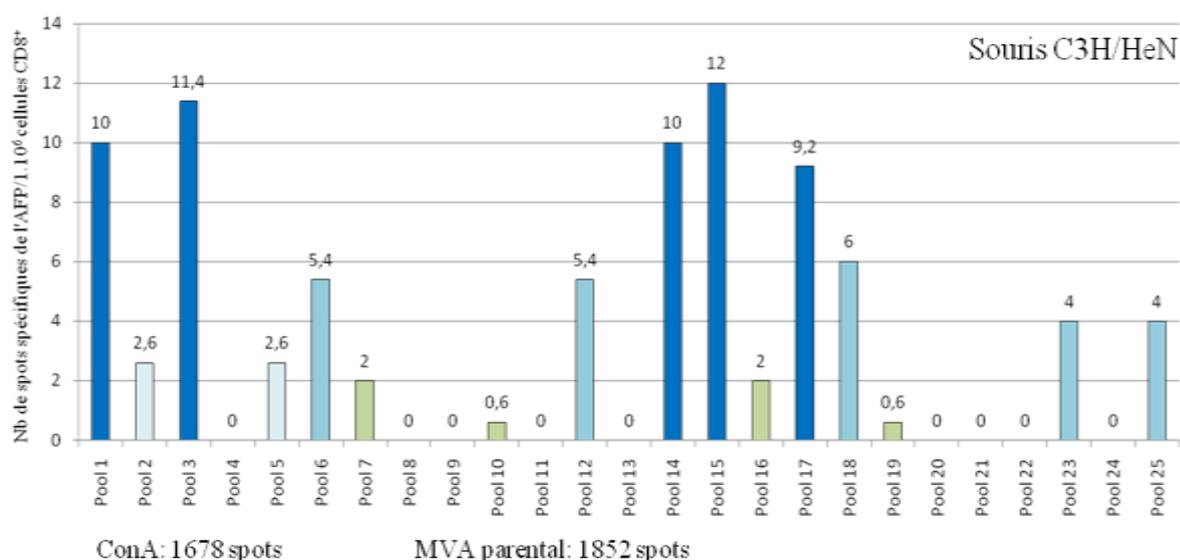
Jusqu'à présent, les réponses immunitaires obtenues après une immunisation avec un vecteur MVA AFP sont faibles comparées à celles précédemment obtenues avec un adénovirus AFP et peu reproductibles. Une hypothèse est que le peptide utilisé pour restimuler les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne soit pas le peptide optimal. En effet, différentes formes de l'AFP ont ici été présentées et surtout, celles-ci sont présentées par un vecteur viral différent.

Afin de s'assurer que la faible réponse immunitaire observée ne soit pas due à un problème technique d'outils de détection, une librairie de peptides a été générée de façon à détenir l'ensemble des séquences constitutives de la protéine. Les expériences présentées ci-après ont pour objectif de mettre en évidence un ou des peptides immunodominants de l'AFP dans le cas d'une présentation par un vecteur MVA dans un contexte H2K-k (souris de souche C3H/HeN) et dans un contexte H2K-b (souris de souche C57BL/6J).

## a) Dans un contexte CMH-I

## (1) Sélection de pools et identification de peptides

Des souris de souche C3H/HeN ont été immunisées selon le protocole classique (3 immunisations de  $5.10^7$  pfu avec MVA mAFP:TMR à 1 semaine d'intervalle et sacrifice 1 semaine après la dernière immunisation). Les splénocytes des différents animaux ont été rassemblés et un tri des lymphocytes CD8<sup>+</sup> a été réalisé. Les cellules obtenues ont été restimulées avec les 25 pools de peptides de l'AFP lors d'un test Elispot (**figure 73**).



**Figure 73 : Réponses spécifiques de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP :TMR après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.**

Le nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> capables de sécréter de l'IFN gamma après une restimulation avec les peptides de l'AFP est faible puisque quelque soit le pool utilisé, un maximum de 12 spots par million de cellules T CD8<sup>+</sup> est détecté. De plus, 11 pools sur 25 ne déclenchent aucune réponse. Cela ne vient pas d'un problème technique lors de l'expérience puisque l'on atteint des niveaux élevés de réponse lorsque l'on restimule avec le MVA parental (moyenne de 1852 spots) ou de façon aspécifique avec la concanavaline ConA (moyenne de 1678 spots).

Deux techniques sont usuellement utilisées pour analyser la réponse spécifique lors de test Elispot. Tous les tests Elispots présentés jusqu'à présent sont analysés de la manière suivante : les cellules sont restimulées avec du milieu de culture (contrôle négatif) et les spots comptés dans cette condition constituent le bruit de fond de l'expérience. Ainsi, avec cette technique, les spots spécifiques correspondent aux spots obtenus lors d'une restimulation avec

des solutions d'activation spécifique auxquels sont retranchés les spots obtenus lors de la restimulation avec le milieu vide. Avec cette technique d'analyse, 16 pools permettent d'obtenir une réponse IFN gamma lors de la restimulation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées.

La deuxième manière possible d'analyser la réponse Elispot est d'établir une valeur référence et de comparer toutes les conditions par rapport à cette référence. La référence représente la moyenne des spots obtenus lors de la restimulation avec le milieu de culture (bruit de fond) + deux fois la déviation standard de cette moyenne. Cette deuxième technique est plus restrictive puisque sur cette expérience elle ne met en évidence que 14 pools mais ceux-ci sont les mêmes que ceux mis en évidence avec la première technique d'analyse. Ainsi pour l'ensemble des Elispots présentés par la suite, la première technique d'analyse sera utilisée.

Les pools ayant engendré une réponse IFN gamma sont identifiés et l'analyse matricielle permet de mettre en évidence les peptides individuels susceptibles d'être responsables de cette réponse (**figure 74**). Les pools engendrant des réponse sont surlignés en bleu et une gamme de couleur bleue est utilisée pour matérialiser les différents niveaux de réponses obtenus avec les différents pools (bleu foncé = niveau de réponse plus élevé).

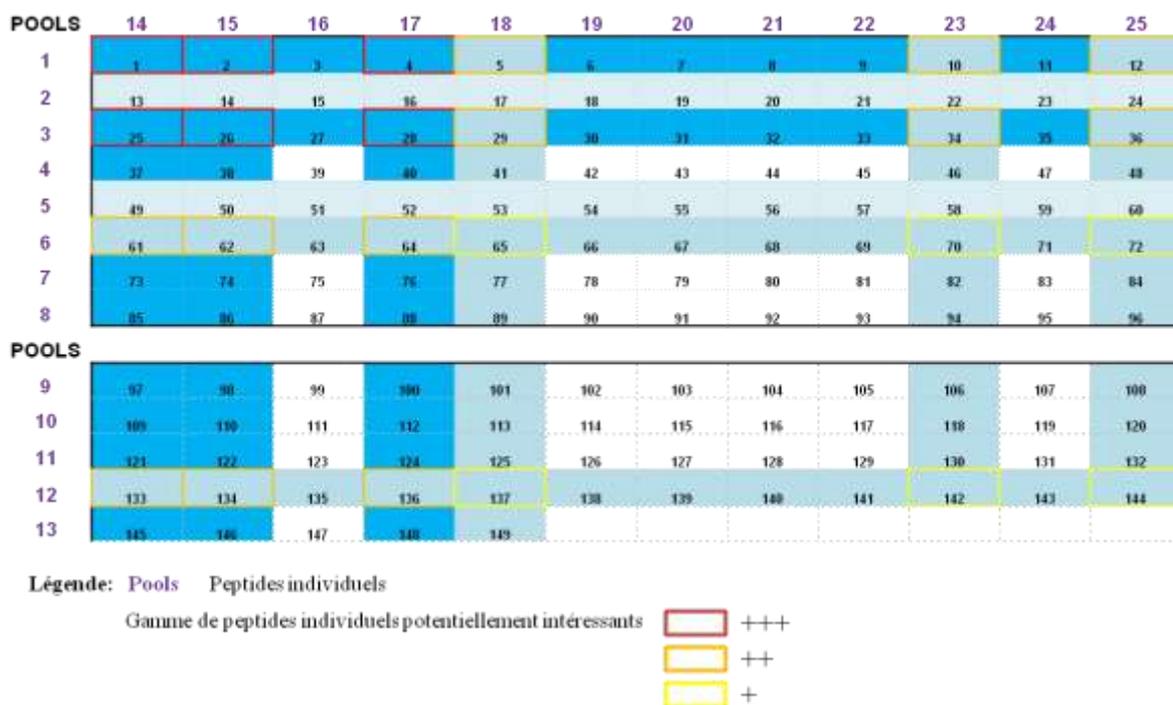
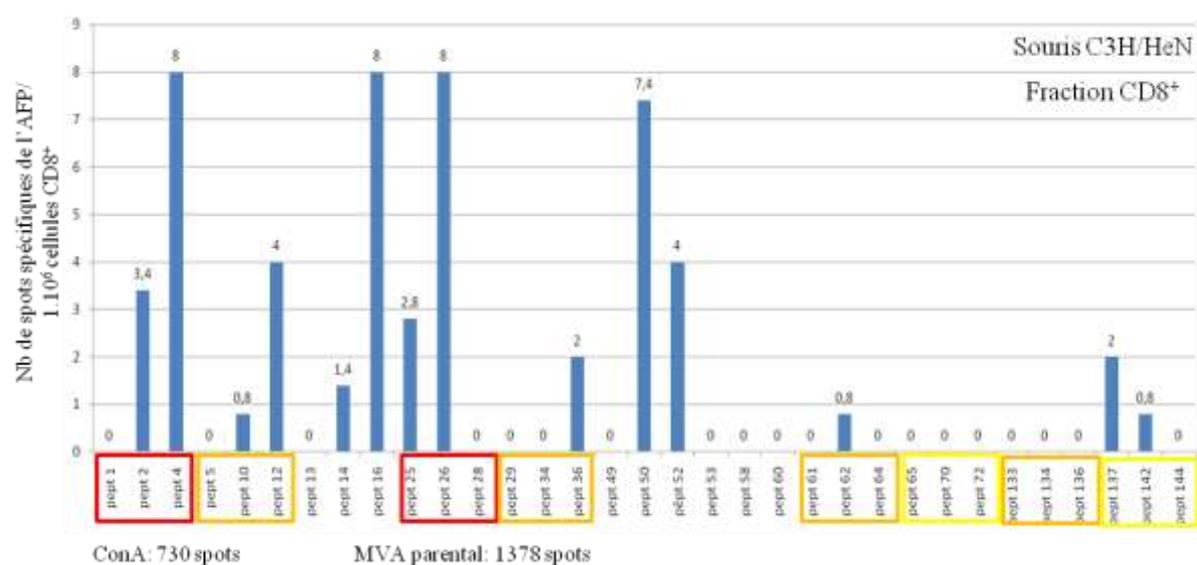


Figure 74 : Analyse matricielle pour l'identification des peptides dans le contexte de la recherche de peptides immunodominants pour le fond H2K-k.

En fonction du niveau de réponse généré par les différents pools de peptides, on identifie 6 peptides (peptide 1, 2, 4, 25, 26, 28) susceptibles d'avoir engendré les plus fortes réponses et 18 autres peptides (peptide 5, 10, 12, 29, 34, 36, 61, 62, 64, 65, 70, 72, 133, 134, 136, 137, 142, 144) à tester individuellement.

## (2) Evaluation des peptides individuels

Des souris de souche C3H/HeN ont été immunisées selon le protocole classique (3 immunisations de  $5.10^7$  pfu avec MVA mAFP :TMR à 1 semaine d'intervalle et sacrifice 1 semaine après la dernière immunisation). Les splénocytes des différents animaux ont été rassemblés et un tri des lymphocytes CD8<sup>+</sup> a été réalisé. Les cellules obtenues ont été restimulées avec les peptides individuels de l'AFP précédemment mis en évidence lors d'un test Elispot (**figure 75**).

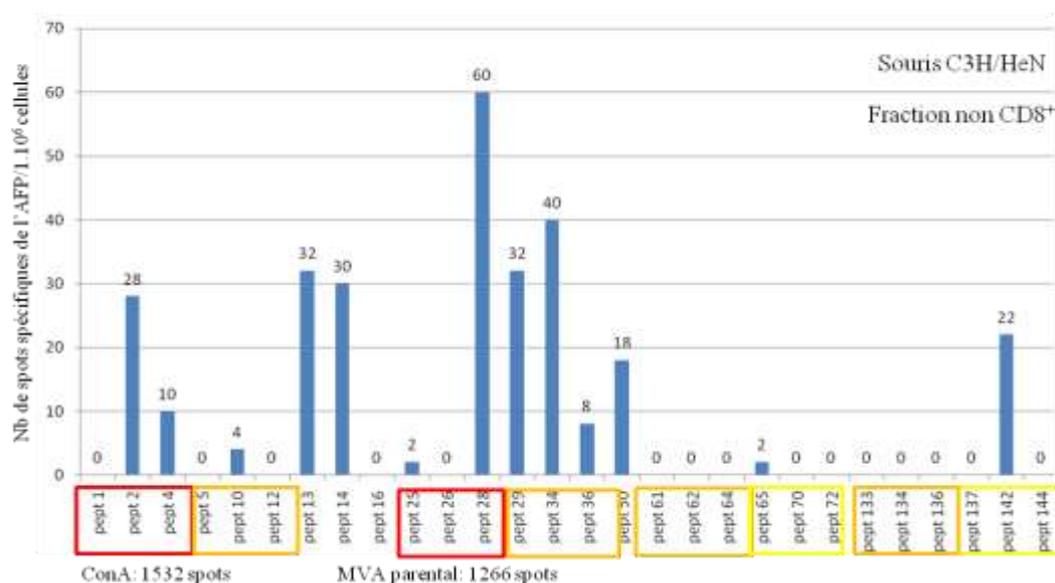


**Figure 75 : Réponses spécifiques de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP :TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.**

Sur les 24 peptides mis en évidence lors du criblage avec les pools (peptides encadrés), 14 ne déclenchent pas de libération détectable d'IFN gamma. Il peut s'agir de peptides pour lequel un fort effet était attendu (peptides 1 et 28). Pour les 10 peptides engendrant une réponse, un maximum de 8 spots par million de CD8 restimulés est obtenu, soit une réponse de même ordre de grandeur que lorsque ces peptides sont présentés avec

d'autres au sein de pool. Il faut noter que des peptides n'ayant pas été sélectionné par l'approche matricielle ont été utilisés pour la restimulation et que la réponse obtenue avec certains d'entre eux est de même niveau que les peptides mis en évidence dans la matrice (peptides 16 et 50).

Lors du tri CD8, la fraction non marquée a été conservée et un Elispot a été réalisé avec ces cellules (**figure 76**). L'idée est de voir si les cellules présentes dans cette fraction peuvent favoriser la présentation des peptides et engendrer une réponse IFN gamma.

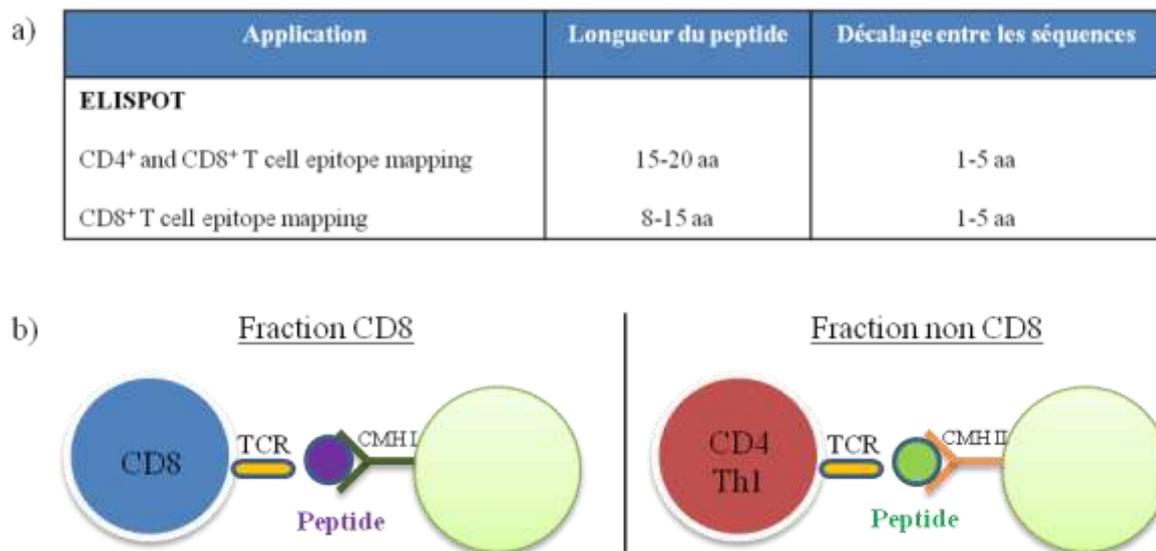


**Figure 76 : Réponses spécifiques de la fraction non CD8<sup>+</sup> de souris C3H/HeN immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP.**

Lorsqu'il y a une sécrétion d'IFN gamma, le niveau de réponse est plus important que pour la fraction CD8 alors que la réponse immunitaire contre le vecteur est similaire. Dans la fraction « non CD8 », les cellules présentes susceptibles de sécréter de l'IFN gamma sont les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Concernant les cellules NK, celles-ci sont activées lors de l'infection par le MVA mais les cellules sont ici récupérées 1 semaine après la dernière immunisation et elles sont présentes de la même façon dans chacun des puits restimulés avec les différents peptides donc l'observation de différents niveaux de réponse suggère que la sécrétion observée d'IFN gamma n'est pas liée aux cellules NK.

Pour rappel, les peptides constituant la librairie ont une taille de 15 acides aminés et le chevauchement entre les peptides est de 4 acides aminés. Selon les indications du fournisseur, les peptides utilisés permettent ainsi lors de tests Elispot de mettre en évidence des peptides

immunodominants pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (**figure 77 a**). Il n'y a pas de corrélation entre les peptides engendrant une réponse pour la fraction CD8 et la fraction non CD8 (peptides 13, 14, 28, 29, 24). Ceci s'explique notamment par le fait que la présentation aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se fait respectivement soit dans un contexte CMH-I soit dans un contexte CMH-II (**figure 77 b**).



**Figure 77 : Présentation théorique des peptides immunodominants.** a) Design optimal de la librairie de peptides pour une détermination par Elispot de peptides immunodominants. b) Présentation des peptides dans un contexte CMH-I et CMH-II.

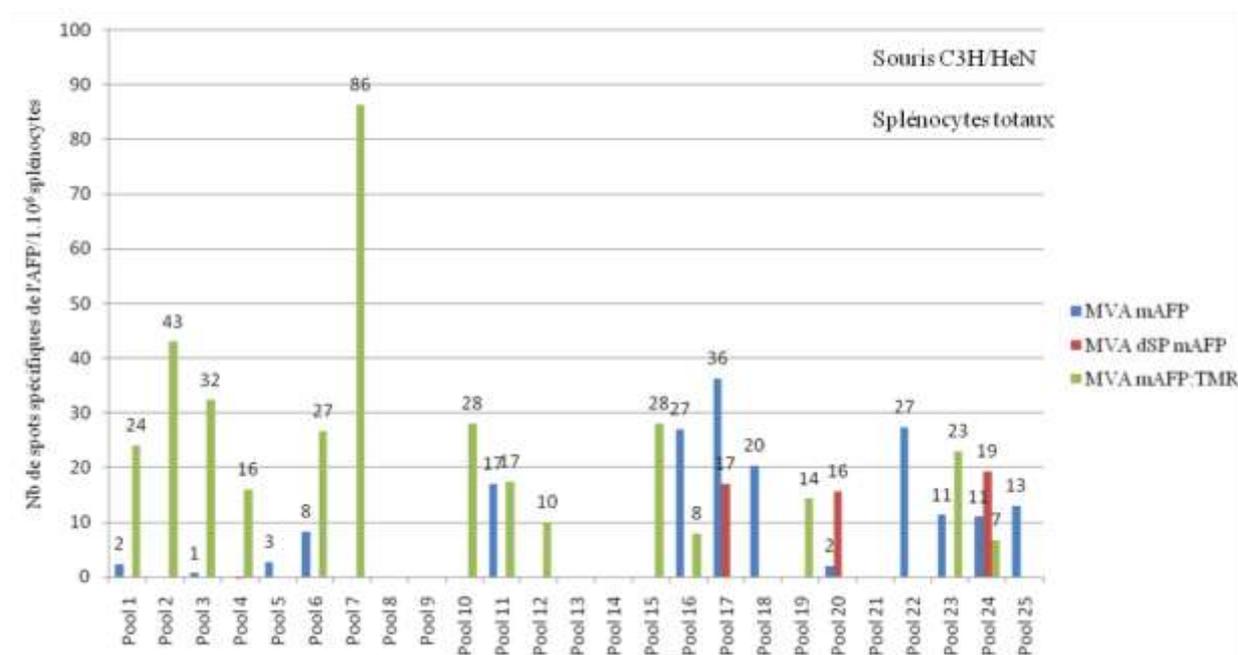
Les résultats obtenus lors de cette expérience préliminaire sur la fraction non CD8 nous a conduits à rechercher des peptides immunodominants en faisant des tests Elispot sur des splénocytes totaux.

*b) Dans un contexte CMH-I et CMH-II*

(1) Dans un fond génétique H2K-k

Des souris de souche C3H/HeN ont été immunisées selon le protocole classique (3 immunisations de  $5 \cdot 10^7$  pfu de MVA recombinant à 1 semaine d'intervalle et sacrifice 1 semaine après la dernière immunisation). Une comparaison de la réponse IFN gamma a été faite après immunisation avec les différents vecteurs MVA exprimant les formes native, intracellulaire et transmembranaire de l'AFP murine. Les splénocytes des animaux de chaque

groupe sont restimulés avec les 25 pools de peptides de l'AFP lors d'un test Elispot (**figure 78**).



**Figure 78** : Comparaison de la réponse spécifique des splénocytes de souris C3H/HeN immunisées avec les différents vecteurs MVA après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.

Une immunisation avec le vecteur MVA mAFP:TMR engendre les niveaux de réponse les plus forts et les splénocytes de ces souris sont restimulés par un plus grand nombre de pools peptidiques (14/25 contre 3/25 pour une immunisation avec MVA dSP mAFP et 13/25 pour une immunisation avec MVA mAFP).

La comparaison de la réponse engendrée par les différents pools lorsque l'Elispot est fait sur des lymphocytes CD8<sup>+</sup> ou sur des splénocytes totaux révèle trois cas de figure :

- certains pools n'engendrent aucune réponse quelque soit les cellules utilisées (pools 8, 9, 13, 14, 20, 21) ;
- d'autres pools engendrent un niveau de réponse similaire (pools 5, 17, 18, 25) ;
- d'autres pools enfin engendrent des réponses plus importantes, entre 2 et 7 fois plus importante (pools 1, 3, 6, 12, 15, 16, 23, 24) ou plus de 15 fois plus importante (pools 2, 4, 7, 10, 11, 19).

Toujours dans le cas de l'immunisation avec le MVA mAFP:TMR, les pools ayant engendré une réponse IFN gamma sont identifiés et 45 peptides individuels susceptibles d'être responsables de cette réponse sont identifiés lors de l'analyse matricielle (**figure 79**).



La réponse engendrée lors de la restimulation avec les trois pools est très variable entre les individus. Ces trois conditions auraient dues servir de contrôle positif puisque lors de la précédente expérience, ces trois pools ont servis à identifier les peptides individuels. On observe qu'alors que le pool 7 engendrait une réponse de 86 spots par million de splénocytes, dans cette expérience, aucun des trois individus testés ne présentent de cellules immunitaires susceptibles d'être activées par les peptides présent dans ce pool.

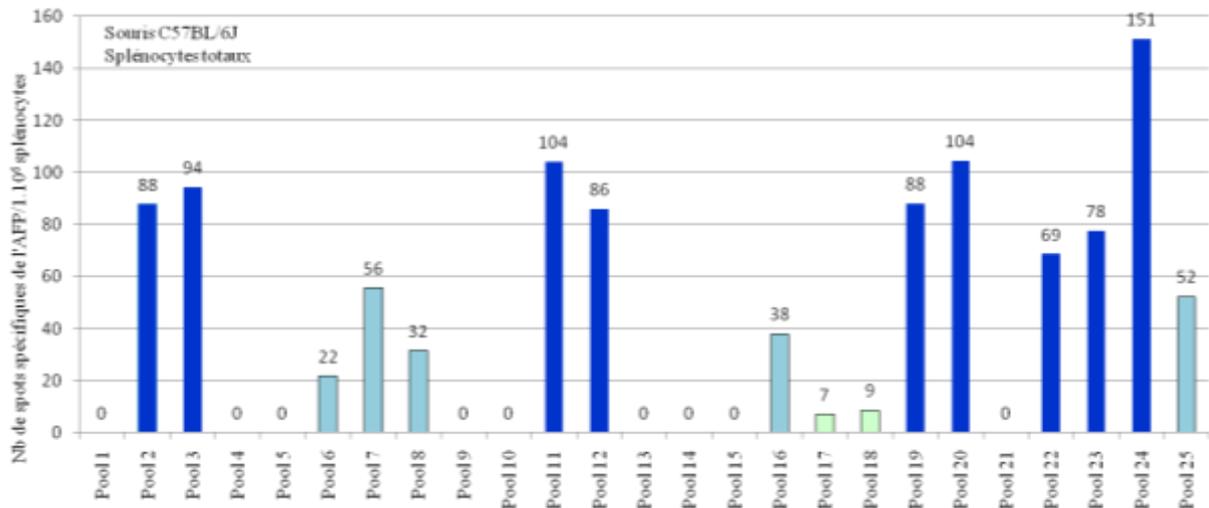
L'analyse des réponses induites par les peptides individuels montre également une très grande hétérogénéité entre les individus. Certains peptides, par exemple le peptide 126 déclenche une forte réponse chez 1 animal (souris 1) et aucune chez les deux autres individus. Dans cette expérience, seul le peptide 135 engendre une réponse notable chez 2 individus sur trois.

En se basant sur cette expérience, il semble raisonnable de penser que la variabilité des réponses observées est due au fait que le niveau de réponse détectée est faible et surement peu en lien avec une réelle réponse immunitaire.

L'ensemble des expérimentations présentées précédemment sur les splénocytes totaux ont également été réalisées dans le fond génétique H2K-b.

(2) Dans un fond génétique H2K-b

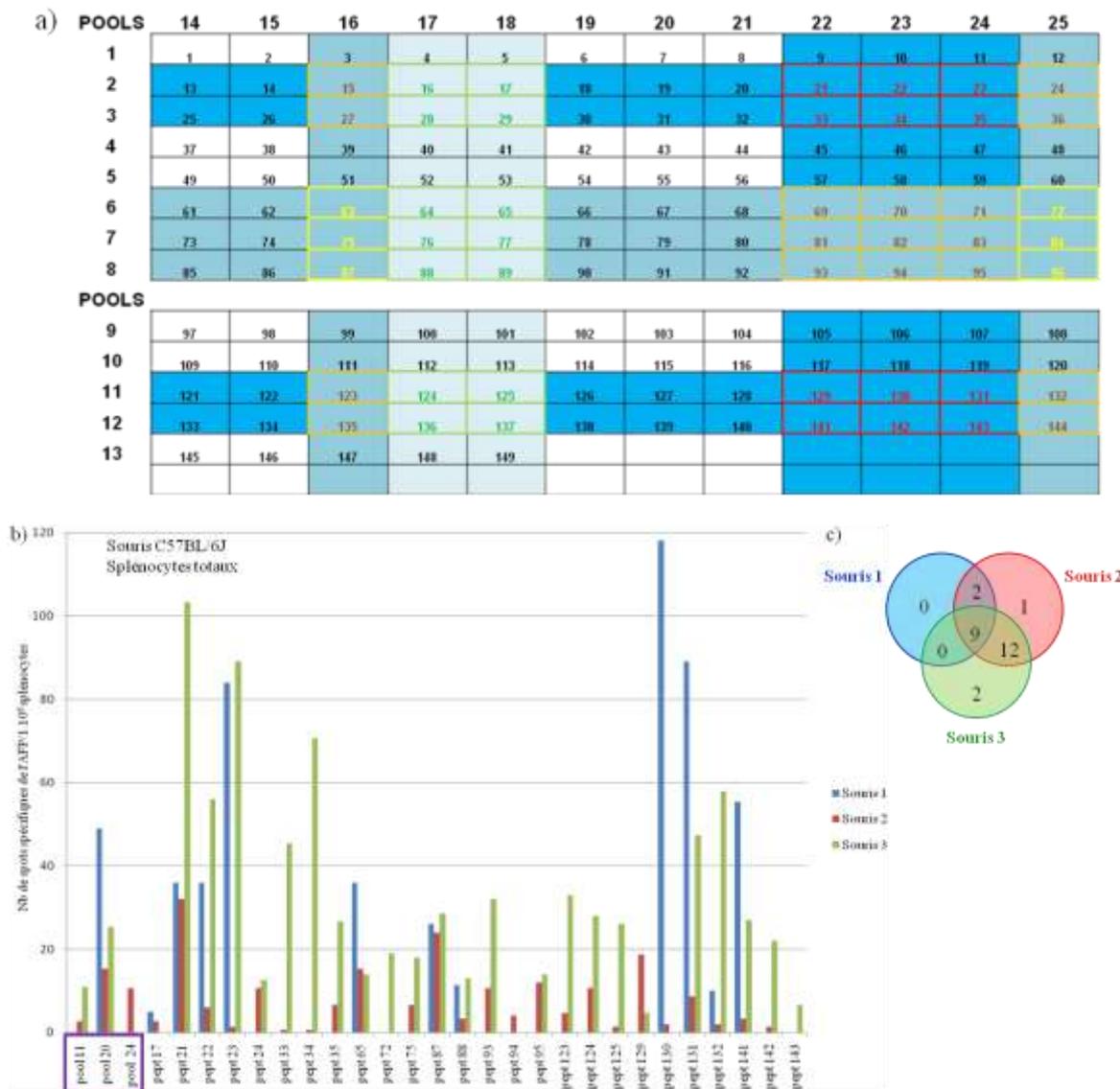
Des souris de souche C57BL/6J ont été immunisées selon le protocole classique (3 immunisations de  $5 \cdot 10^7$  pfu de MVA mAFP:TMR à 1 semaine d'intervalle et sacrifice 1 semaine après la dernière immunisation). Les splénocytes sont restimulés avec les 25 pools de peptides de l'AFP lors d'un test Elispot (**figure 81**).



**Figure 81 : Réponses spécifiques des splénocytes de souris C57BL/6J immunisées avec MVA mAFP :TMR après restimulation avec les pools de peptides de l'AFP.**

Neuf pools sur 25 n'engendrent aucune réponse IFN gamma, 9 pools engendrent une réponse d'au moins 70 spots par million de splénocytes et 7 pools engendrent une réponse plus modérée. Par comparaison avec le profil obtenu sur le fond H2K-k, 16 pools engendrent dans le fond H2K-b une réponse contre 14 dans le fond H2K-k et les niveaux de réponse obtenues avec les souris C57BL/6J sont plus élevés. D'autre part, 10 pools engendrent une réponse de type IFN gamma à la fois dans le fond H2K-k et dans le fond H2K-b.

Les peptides mis en évidence lors de l'analyse matricielle (**figure 82 a**) sont testés individuellement lors d'une nouvelle expérience d'Elispot réalisée sur trois souris de souche C57BL/6J. Les splénocytes de chacun de ces trois animaux sont également restimulés avec trois des pools (pools 11, 20 et 24) ayant engendré une forte réponse (**figure 82 b**).



**Figure 82 : Analyse de la réponse spécifique des splénocytes de trois souris C57BL/6J immunisées avec MVA mAFP:TMR après restimulation avec des séquences peptidiques de l'AFP. a) Analyse matricielle. b) Analyse Elispot. c) Représentation des peptides engendrant une réponse chez les différents animaux.**

Comme dans le fond H2K-k, la réponse engendrée lors de la restimulation avec les trois pools est encore une fois variable. Alors que les trois individus testés répondent au pool 20, 2 animaux sur 3 ne répondent pas ou très faiblement aux deux autres pools contrôles, pools 11 et 24.

Concernant la restimulation avec les peptides individuels, les splénocytes des souris 2 et 3 répondent à la grande majorité des peptides testés (respectivement 24 réponses/26 et 23 réponses/26) contrairement aux splénocytes de la souris 1 (11/26). Neuf peptides permettent d'engendrer une réponse chez les trois individus avec cependant des niveaux de réponse qui peuvent s'avérer très différents entre individus.

## C. L'immunisation induit une réponse humorale

### 1. Suivi du titre en anticorps sur un protocole court d'immunisation

#### a) Recherche d'anticorps spécifique de l'AFP

Des souris C3H/HeN ont été immunisées suivant le protocole classique de trois injections de MVA recombinant à 1 semaine d'intervalle aux jours 0, 7 et 14. Les souris sont immunisées soit avec le vecteur MVA mAFP:TMR, soit avec le vecteur MVA mAFP, soit avec le vecteur dSP mAFP. Des souris immunisées avec le vecteur MVA parental servent de contrôle négatif. Au jour 21, les animaux sont sacrifiés et le sérum est récupéré pour doser le titre en anticorps anti-AFP à différentes dilutions (**figure 83**).

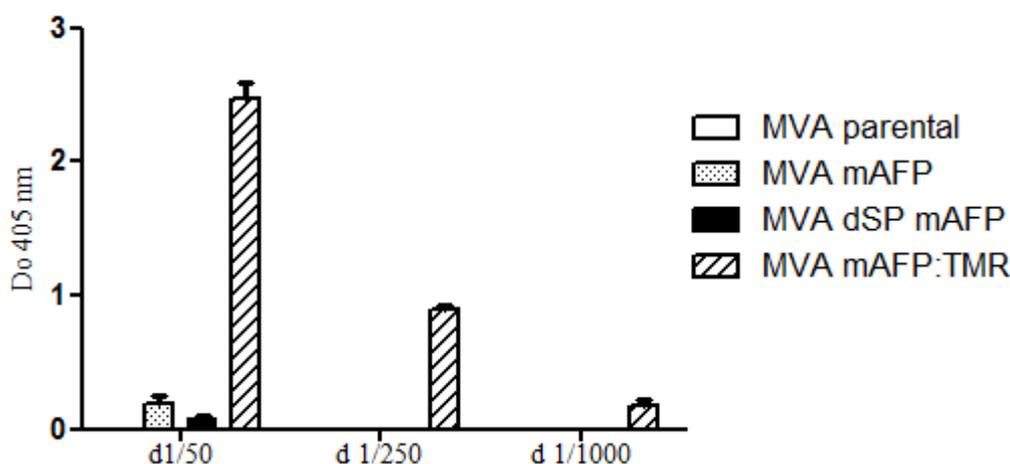


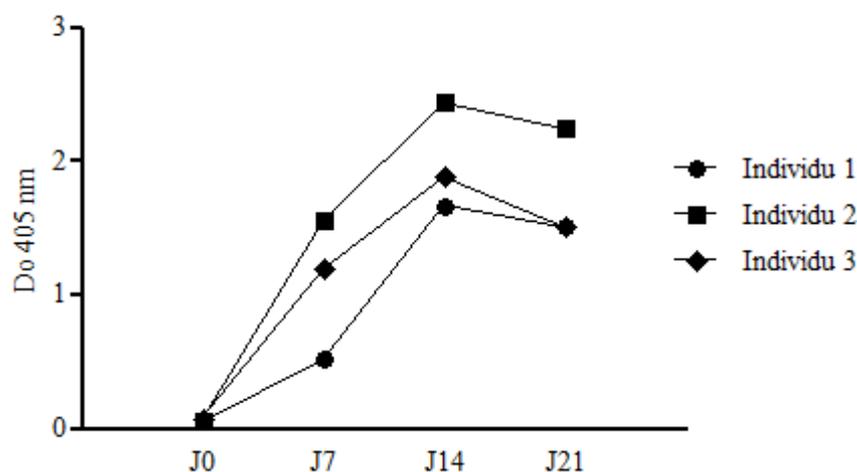
Figure 83 : Titre en anticorps anti-AFP en fonction du vecteur d'immunisation et de la dilution (1/50, 1/250, 1/1000).

Les souris immunisées avec les vecteurs MVA dSP mAFP et MVA mAFP présentent un profil d'anticorps spécifiques de l'AFP semblable au profil des souris immunisées avec le vecteur parental. En effet, hormis pour la dilution au 1/50<sup>ème</sup>, la technique utilisée ne permet pas de détecter d'anticorps.

Par contre, les souris immunisées avec les vecteurs MVA mAFP:TMR présentent dans leur sang circulant des anticorps anti-AFP mis en évidence jusqu'à une dilution au 1/1000<sup>ème</sup> du sérum. Il semble donc que le protocole d'immunisation employé déclenche, dans le cas de l'immunisation avec la forme transmembranaire de l'AFP, une réponse immunitaire de type humorale détectable 7 jours après la dernière immunisation.

*b) Suivi du titre en anticorps lors d'un protocole court d'immunisations*

Trois souris C3H/HeN ont été immunisées suivant le protocole classique de trois injections de MVA mAFP:TMR à 1 semaine d'intervalle aux jours 0, 7 et 14. Des échantillons sanguins sont prélevés aux jours 0, 7, 14 et 21 et le dosage des anticorps anti-AFP est réalisé à l'aide du test Elisa (**figure 84**).



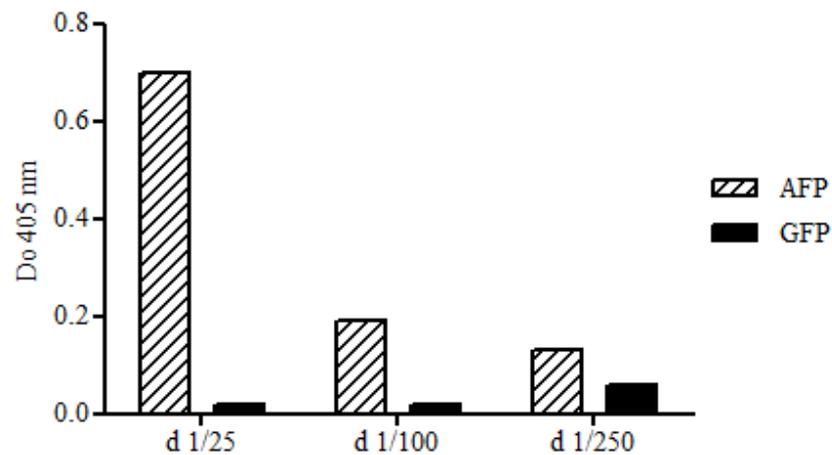
**Figure 84 :** Suivi du titre en anticorps anti-AFP au cours du protocole d'immunisation à la dilution sérique 1/50<sup>ème</sup>.

Un profil similaire est observé chez les trois individus testés. Avant la première injection au jour 0, les souris ne présentent pas d'anticorps anti-AFP. La détection d'anticorps est possible 7 jours après la première injection et une augmentation de la quantité d'anticorps circulants est visible jusqu'au jour 14. Ainsi, la réponse humorale détectée est directement induite par les immunisations réalisées avec le vecteur MVA recombinant.

## 2. Détermination du titre en anticorps sur un protocole long d'immunisation

Dans le modèle de carcinome hépatocellulaire murin chimiquement induit, les souris reçoivent 4 injections de MVA mAFP:TMR à deux semaines d'intervalle entre 4 mois et 5 mois ½ d'âge. Les animaux sont sacrifiés à 8 mois soit 2 mois ½ après la dernière injection. Un échantillon de sang est prélevé lors du sacrifice pour évaluer la présence d'anticorps anti-

AFP. La **figure 85** compare le titre en anticorps détecté lorsque le sérum est mis en présence de protéines recombinantes GFP ou AFP.



**Figure 85 : Détermination du titre en anticorps anti-AFP chez une souris de 2 mois ½ après la dernière immunisation MVA mAFP:TMR.**

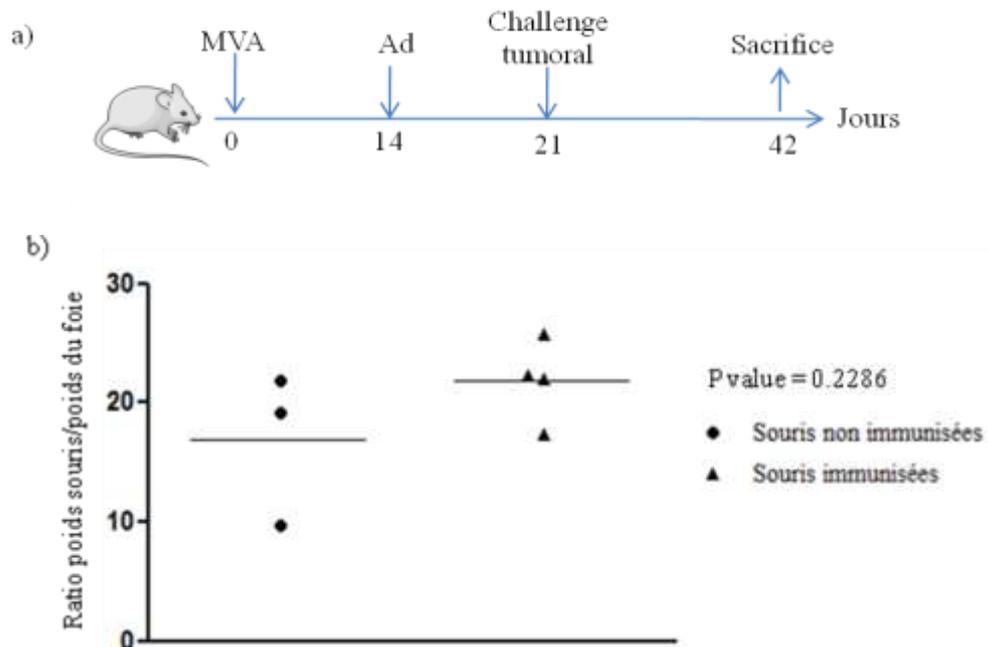
La comparaison avec la condition GFP met en évidence la présence d'anticorps dans le sérum de la souris testée qui sont spécifiquement dirigés contre la protéine recombinante de l'AFP présente. Il est intéressant de noter que même si, comparé aux valeurs d'absorbance obtenues sur le protocole court, les valeurs sont ici plus faibles, celles-ci restent détectables 2 mois et demi après la dernière immunisation AFP.

Ainsi, alors que nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon claire une réponse immunitaire de type CD8, il semble que l'immunisation avec un vecteur MVA permet une réponse humorale durable.

## D. Effet thérapeutique

### 1. Sur le modèle orthotopique

Des souris de souche C3H/HeN sont immunisées à J0 avec le MVA mAFP:TMR et à J14 avec un adénovirus mAFP (**figure 86 a**). Ce protocole d'immunisation préventive est suivi d'un challenge tumoral à J21 avec des cellules tumorales exprimant l'AFP. Un groupe de souris non immunisées sert de contrôle négatif. Les souris sont sacrifiées à J42. L'effet de la vaccination est évalué en comparant les ratios poids du foie/ poids de la souris du groupe immunisé et du groupe contrôle (**figure 86 b**). Le ratio référence d'une souris saine est de 5.



**Figure 86 : Effet thérapeutique dans un modèle orthotopique.** a) Protocole d'immunisation. b) Effet thérapeutique de l'immunisation par prime-boost dans un modèle orthotopique. Test statistique Mann Whitney.

Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes. L'absence d'effet de l'immunisation préventive sur la croissance tumorale peut être due au développement très rapide de la pathologie dans ce modèle. Des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'AFP avaient pourtant été détectés en Elispot lors de ce protocole de prime-boost.

## 2. Sur le modèle chimiquement induit

Des mâles F1 issus du croisement de femelles C57BL/6J avec des mâles C3H/HeN reçoivent un carcinogène chimique à J15. Cinq groupes de 10 animaux sont immunisés suivant des protocoles présentés dans la **figure 87**. Un groupe noté contrôle sain de 4 souris n'a pas reçu l'agent carcinogène et sert de témoin sain. Les animaux sont sacrifiés à 8 mois et les différents groupes sont comparés en se basant sur le ratio de poids (**figure 88**), le nombre de nodules (**figure 89**) et la surface tumorale (**figure 90**).

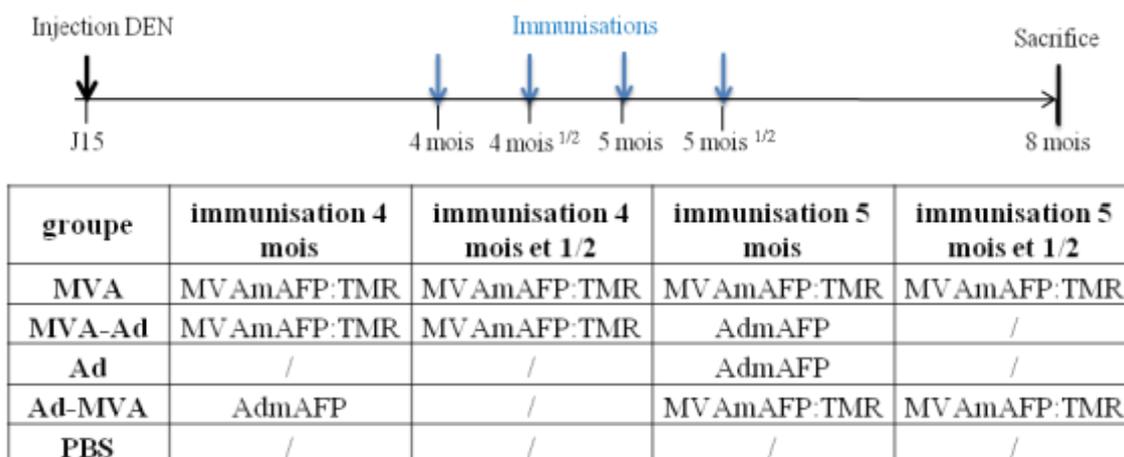


Figure 87 : Protocole d’immunisation sur le modèle de CHC chimiquement induit.

Chez les animaux sains, le ratio poids du foie/ poids de la souris est de 4,58 à 8 mois (figure 88). En dehors de ces animaux sains, quelque soit le groupe, il faut noter une très importante variabilité inter individus avec, dans un même groupe, des animaux pouvant être considérés comme « normaux » (ratio de 5) et des animaux présentant un ratio de plus de 18% (groupe MVA-Ad). Lorsque l’on compare les ratios moyens, le groupe « Adénovirus » présente le ratio le plus proche de la référence saine, cependant il n’y a pas de différence significative avec le groupe « PBS ». Comme observé lors des analyses Elispot, il n’y a pas d’effet cumulatif lorsque les souris sont immunisées avec les deux vecteurs viraux. Quelque soit le protocole d’immunisation testé, aucun ne permet d’obtenir un effet significativement différente des souris non immunisées dans les conditions de l’essai.

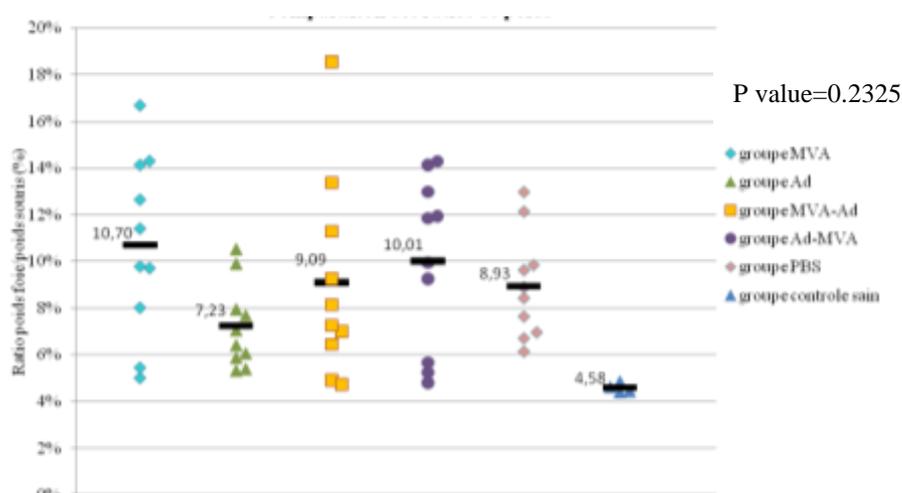


Figure 88 : Comparaison des ratios de poids. Test Kruskal-Wallis.

Les souris non immunisées contre l’AFP (groupe PBS) présente environ 1,5 fois plus de nodules tumoraux que les autres groupes (figure 89). Par rapport à la comparaison des

ratios de poids, on peut donc penser que les nodules développés dans ces souris sont moins denses que ceux développés dans les groupes immunisés avec les vecteurs viraux. Comme lors de l'observation des ratios de poids, il y a une très grande hétérogénéité du nombre de nodules dans chacun des groupes. Aucune différence significative n'est observée entre les 4 protocoles d'immunisations.

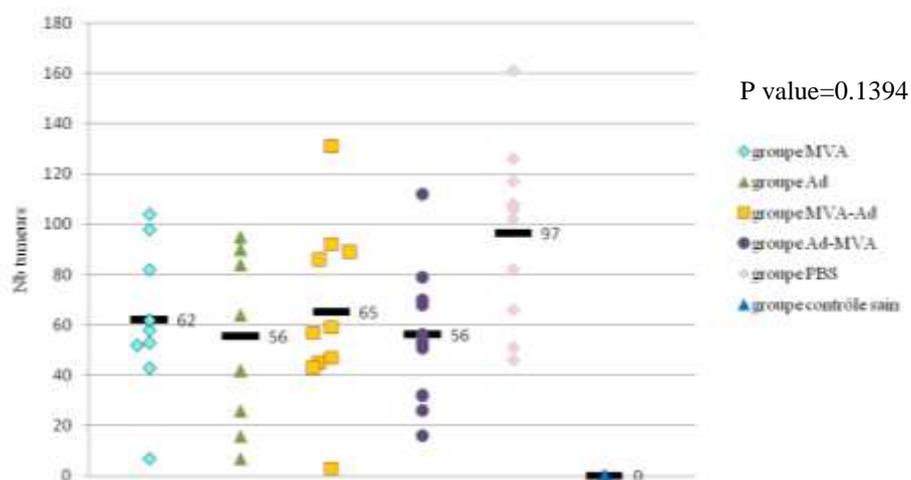


Figure 89 : Comparaison du nombre de nodules hépatiques. Test Kruskal-Wallis.

En corrélation avec le plus grand nombre de nodules développés, les souris non immunisées contre l'AFP (groupe PBS) présentent une surface tumorale plus importante qui n'est cependant pas significativement différente de celle observée dans les autres groupes (figure 90).

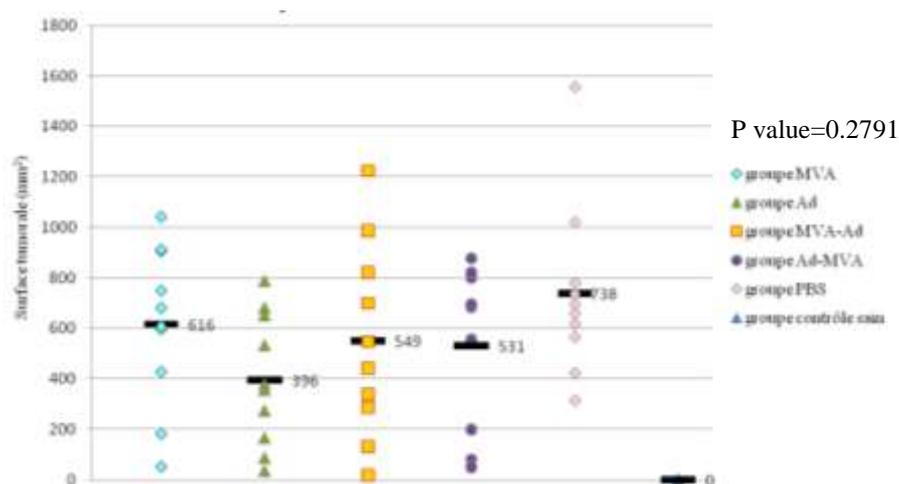


Figure 90 : Comparaison de la surface tumorale. Test Kruskal-Wallis.

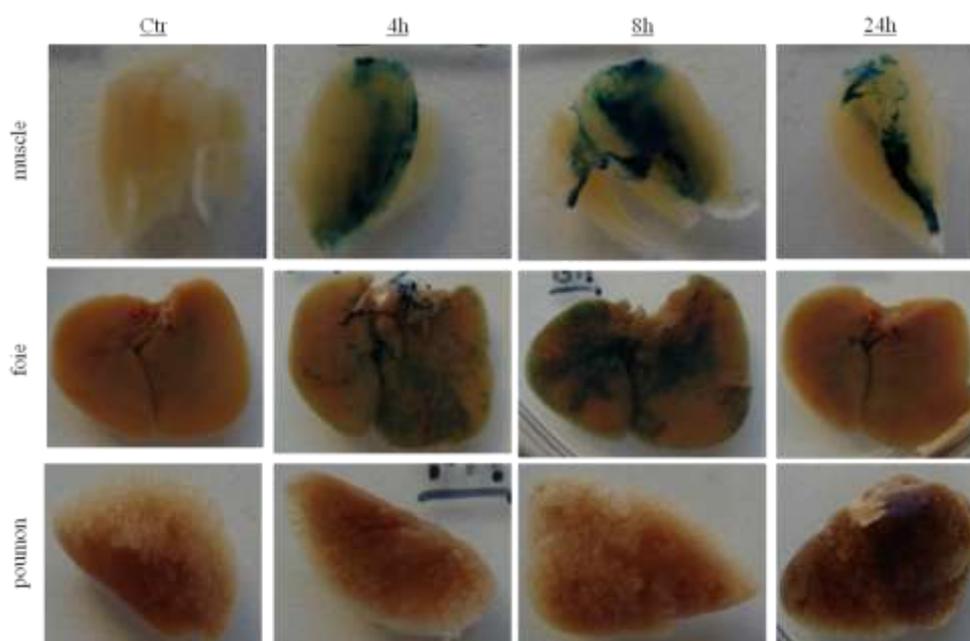
L'analyse globale de cet essai met en évidence la très grande hétérogénéité entre les individus et cela, quelque soit le protocole d'immunisations testé. Ce modèle est relativement

lourd à mettre en place et surtout très long. Pour pallier à l'hétérogénéité de réponse, des groupes de 10 animaux ont été constitués mais cela reste visiblement insuffisant.

## E. Biodistribution du vecteurs MVA hNIS

### 1. Suivi indirect par marquage X-gal

De façon à suivre l'expression du transgène exprimé par le MVA recombinant, une première expérience a été réalisée en immunisant des souris C57BL/6J avec un MVA codant pour la  $\beta$ -galactosidase. La voie d'injection intramusculaire dans le muscle antérieur du tibia a été utilisée ainsi que la voie d'injection intrapéritonéale. Un animal non immunisé sert de contrôle négatif. Les animaux sont sacrifiés 4 heures, 8 heures ou 24 heures après l'injection. Certains organes (tibia antérieur dans le cas de l'injection intramusculaire, foie et poumon dans le cas de l'injection par voie intrapéritonéale) sont prélevés et colorés lors d'un marquage X-gal (**figure 91**).



**Figure 91 : Coloration X-gal de différents organes injectés par voie intramusculaire (muscle) ou intrapéritonéale (foie et poumon) et récupérés à des temps variable après l'injection d'un MVA  $\beta$ galactosidase.**

Alors qu'aucun marquage n'est visible dans les organes contrôles, une coloration spécifique dans le muscle et dans le foie est détectable. D'un point de vue de la cinétique, ce

marquage est visible 4 heures après injection et celui-ci s'intensifie au temps 8 heures. Moins clair dans le muscle que dans le foie, ce marquage est beaucoup plus limité au temps 24 heures. Il semble ainsi que le transgène exprimé par le vecteur MVA soit exprimé très rapidement après l'infection et que cette expression soit transitoire. Ces observations sont cohérentes avec celles faites par deux équipes lors d'expérience de bioluminescence (Gomez et al., 2007; Ramirez et al., 2000a). D'autre part, lors d'une injection intrapéritonéale, le MVA cible le foie mais ne cible pas, ou en tout cas, n'exprime pas son transgène au niveau des poumons.

## 2. Suivi direct par SPECT

Des animaux C57BL/6J ont été immunisés avec  $5.10^7$  pfu de MVA hNIS. Ces animaux sont suivis par SPECT à des temps variables après l'injection de technétium.

Les images obtenues indiquent que 4 heures après une injection par voie intraveineuse, le foie est infecté par le MVA hNIS. L'incorporation de technétium n'est cependant pas détectée dans cet organe à des temps plus long après l'injection. Des techniques de reconstruction plus fines sont actuellement utilisées pour analyser plus en détail les images obtenues.

# Discussion générale et Conclusion

## V. Discussion générale et conclusion

La preuve de concept d'une immunothérapie du CHC basée sur l'alpha foetoprotéine a été faite dans le modèle murin dès 1999 par l'équipe de Vollmer (Vollmer et al., 1999). Cette même année, l'équipe de Butterfield démontre que des clones lymphocytaires persistent dans le répertoire murin et cela, malgré la forte exposition à l'antigène au cours de la vie foetale (Butterfield et al., 1999). De nombreux essais pré-cliniques, basés sur l'utilisation de cellules dendritiques, de plasmides ADN, de vecteurs adénoviraux, peptidiques ou protéiques, ont permis de générer des réponses CTL spécifiques de l'AFP et des effets protecteurs contre des challenges tumoraux. Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour objectif d'évaluer les réponses immunitaires et thérapeutiques initiées par une approche originale d'immunisation avec des vecteurs MVA recombinants exprimant l'AFP.

### Recherche d'une réponse CD8 induite par la vaccination MVA

La majorité des approches d'immunothérapie est basée sur la génération de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la tumeur et qui reconnaissent des peptides de 8 à 11 acides aminés présentés par des complexes CMH de classe I (Greten et al., 2006).

Notre première approche a donc été d'immuniser des souris C3H/HeN selon un protocole classique et de déterminer la réponse CD8<sup>+</sup> induite. Dans un protocole constitué de trois injections de  $5.10^7$  pfu du vecteur MVA codant pour la forme transmembranaire de l'AFP, une réponse spécifique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> significativement supérieure à celle obtenue lors de l'immunisation avec un vecteur viral contrôle a été obtenue. Cependant, seuls 40 lymphocytes spécifiques de l'AFP en moyenne sont détectés par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> analysés.

Comme cela a été expliqué précédemment, les outils immunologiques spécifiques de l'AFP ne sont pas disponibles chez la souris. Les premières réponses immunitaires ont donc été recherchées avec un peptide de l'AFP décrit par algorithme et sélectionné lors de la vaccination de souris C3H/HeN avec un adénovirus codant l'AFP murine. Il a donc été envisagé que la faible réponse CTL observée soit liée à un problème technique d'outils de détection dans le contexte d'une vaccination poxvirale. De façon à s'affranchir de cette éventualité, une librairie de peptides chevauchants de l'AFP murine a été générée. De cette

façon, l'ensemble de la réponse T spécifique de la protéine peut être évalué de façon rapide et efficace. Les peptides de 15-mer générés sont modifiés dans l'espace extracellulaire en plus petits peptides pouvant être présentés sur des molécules CMH de classe I et de classe II (Sherman et al., 1992).

### De nouveaux outils immunologiques pour mettre en évidence une réponse cellulaire

A l'aide de la librairie de peptides, un criblage des peptides immunodominants de l'AFP présentés par les vecteurs MVA a été réalisé à la fois dans le fond génétique murin H2K-k et H2K-b et dans un contexte de présentation CMH-I seul ou CMH-I et CMH-II.

Malheureusement, quelque soit la condition testée, aucun des 149 peptides évalués ne semble être déclencheur d'une réponse CTL spécifique et reproductible. Ce résultat est difficile à expliquer car bien que l'AFP soit un antigène du soi et donc que la problématique de la tolérance se pose, l'immunothérapie basée sur les vecteurs viraux doit limiter ce phénomène.

En effet, la faible immunogénicité des antigènes associés aux tumeurs doit être compensée par la présentation au système immunitaire de l'antigène du soi couplé au vecteur viral étranger. D'ailleurs, l'infection poxvirale conduit à la production de protéines immunomodulatrices qui activent le système immunitaire inné, événement crucial pour l'induction d'une forte réponse adaptative (Kennedy et al., 2009). De plus, une réponse T spécifique de l'AFP détectable par Elispot IFN gamma de l'ordre de 300 spots par million de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est obtenue avec d'autres vecteurs viraux, comme par exemple l'adénovirus.

### Vecteurs MVA et présentation d'un antigène du soi

Des réponses immunitaires et thérapeutiques prometteuses ont été obtenues lors d'immunisations avec les vecteurs MVA. Ce vecteur viral a également été utilisé avec succès dans le cadre de la vaccination contre un antigène du soi.

On peut citer notamment les travaux de l'équipe de Harrop où l'utilisation d'un vecteur MVA codant pour l'antigène oncofoetal 5T4 humain permet la génération dans le modèle murin de réponse anticorps et cellulaire de type CD4 qui engendrent un effet thérapeutique notable (Harrop et al., 2006b). Des souris Balb/c sont immunisées avec deux

injections de MVA h5T4 ( $10^7$  pfu par voie intrapéritonéale) et la réponse IFN gamma est analysée en Elispot avec une restimulation des splénocytes avec des cellules de colon exprimant de façon stable l'antigène h5T4. La réponse cellulaire déclenchée est mesurée puisque seulement 50 spots par millions de splénocytes sont dénombrés. Cependant, une réponse humorale est décrite et celle-ci est de plus durable puisqu'elle est encore détectée 6 mois après la dernière immunisation. D'un point de vue thérapeutique, la vaccination avec MVA h5T4 permet une protection contre un challenge tumoral réalisé 6 mois après la vaccination ainsi qu'une diminution largement significative d'une charge tumorale pré-existante. A noter que ces résultats sont obtenus dans le cadre d'une vaccination MVA avec un antigène du soi dans un contexte de xénoimmunisation puisque la forme humaine de l'antigène est utilisée.

Une autre équipe a décrit dans un modèle de souris transgéniques la capacité des MVA à surmonter la tolérance (Song et al., 2007). Des souris Hupki, génétiquement modifiées pour exprimer la copie humaine de p53, sont immunisées avec un MVA recombinant exprimant cette protéine. Alors qu'une immunisation unique de ces souris transgéniques avec le MVA recombinant ne permet pas de déclencher une production d'IFN gamma suite à une stimulation *in vitro* avec une librairie de peptides de p53, un protocole à deux injections à deux semaines d'intervalle permet d'identifier des populations CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> spécifiques de p53. Dans un contexte tolérogène, cette immunisation assure de plus un rejet de cellules tumorales hautement agressives exprimant p53 humain.

Ainsi, le simple fait que l'AFP soit un antigène du soi ne permet pas d'expliquer l'absence de réponse cellulaire observé au cours de notre étude.

#### Une réponse CTL contre le vecteur trop prédominante?

Une explication possible pourrait résider dans le fait qu'une forte réponse cellulaire contre le vecteur MVA se mette en place lors de l'immunisation et masque les réponses immunitaires plus faibles.

Au cours du développement des cellules T, la sélection négative élimine du répertoire les cellules T auto-réactives de très forte affinité. Ainsi, les clones lymphocytaires maintenus sont des cellules T de faible affinité et constituent le répertoire spécifique de l'antigène

tumoral susceptible d'être activé lors de la vaccination anti-cancéreuse (Bouneaud et al., 2000; Sebzda et al., 1999).

Il a été montré que la compétition des CTL pour la reconnaissance des antigènes à la surface des CPA pouvait conduire à l'immunodominance de populations CTL de haute fréquence (Kedl et al., 2003; Palmowski et al., 2002). Plusieurs paramètres influent sur l'immunodominance dont 1) l'affinité de liaison entre le peptide et le CMH-I ; 2) l'efficacité du ciblage du TCR par le complexe CMH-I-peptide ; 3) l'efficacité de traitement et de présentation du peptide ; 4) le répertoire T et 5) la compétition des cellules T à la surface des CPA (Yewdell and Bennink, 1999).

La hiérarchie de la réponse CTL a été étudiée dans le cadre d'un essai clinique basé sur l'utilisation d'un MVA recombinant (Smith et al., 2005a). Les patients ont reçu des injections répétées de MVA recombinant exprimant plusieurs épitopes antigéniques du mélanome. Une analyse de la réponse CTL de ces patients a été faite en comparant la réponse CTL dirigée contre le vecteur et celle dirigée contre les antigènes du mélanome. Cette étude montre que la vaccination conduit à une hiérarchie de réponse CTL dominée par une réponse spécifique contre les épitopes spécifiques du virus MVA et cela, y compris chez les patients n'ayant aucune immunité préexistante pour le vecteur. Il est également intéressant de souligner que dans ce contexte un seul épitope du mélanome est capable d'induire une réponse CTL et qu'aucune réponse spécifique n'est mise en place contre un épitope de plus faible affinité (NY-ESO-1<sub>157-165</sub>).

Ainsi, il semble que l'immunodominance de la réponse CTL spécifiquement dirigée contre le vecteur MVA limite l'efficacité de stratégies de vaccination avec des poxvirus. Replacé dans notre problématique, on pourrait envisager que la faible réponse attendue spécifique de l'AFP soit masquée par la très forte réponse immunitaire de la souris immunisée contre le vecteur MVA, réponse que l'on a effectivement observée lors des analyses Elispot IFN gamma.

#### Détection d'une réponse anticorps spécifique de l'AFP par la vaccination MVA

L'absence de réponse cellulaire de type CD8 nous a conduits à chercher une réponse humorale. Ne disposant pas d'outils simples pour mettre en évidence les anticorps spécifiques de l'AFP, un test Elisa atypique a été mis au point.

Celui-ci nous a permis de montrer que, seule une vaccination avec le MVA codant pour la forme transmembranaire de l'AFP conduit à une réponse humorale. Cette réponse nous permet de conclure que le protocole d'immunisation effectué déclenche effectivement une stimulation du système immunitaire de l'hôte.

Comme dans le cadre de la recherche d'une réponse CD8, il est surprenant de noter que la vaccination avec la forme native sécrétée ou avec la forme intracellulaire de l'AFP murine ne met en place aucune réponse significativement différente de celle obtenue lors de l'immunisation avec un vecteur MVA vide.

Le suivi du titre en anticorps circulants chez trois individus montre que l'immunisation avec MVA mAFP:TMR conduit à un profil assez reproductible, à savoir une augmentation des anticorps circulants suite aux deux premières injections (J0 et J7) pour atteindre un palier après la troisième injection (J14). De plus, bien que cela n'ait été vérifié que sur une souris, la réponse humorale semble être durable puisque des anticorps spécifiques de l'AFP sont détectés près de deux mois et demi après la dernière immunisation.

L'exemple le plus marquant de l'induction d'une réponse anticorps suite à une vaccination avec un MVA recombinant est le travail réalisé avec le vecteur Trovax décrit précédemment (Harrop et al., 2006b). Dans ce modèle murin préclinique de carcinome du colon, l'effet thérapeutique notable observé chez les souris immunisées avec le MVA h5T4 est dépendant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induit par les anticorps spécifiques de l'antigène.

#### L'immunisation MVA AFP n'entraîne pas d'effet thérapeutique dans nos modèles de CHC murins

Deux modèles de CHC murins ont été développés au laboratoire. Dans les deux cas, l'idée est de mimer au mieux la pathologie clinique humaine. Ainsi le premier modèle est un modèle orthotopique obtenu suite à l'injection par la veine porte de cellules cancéreuses hépatiques. Un protocole de prime boost MVA adénovirus a été évalué dans ce modèle mais aucun effet bénéfique de la vaccination n'a pu être mis en évidence. Une explication probable est le développement rapide du modèle. En effet, 21 jours après l'injection des cellules cancéreuses, le ratio poids du foie/ poids de la souris est près de trois fois supérieur au ratio d'animaux sains. Ainsi, la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> mise en évidence par Elispot lors de ce protocole d'immunisation n'est pas suffisamment puissante pour enrayer la prise tumorale de ce modèle très agressif.

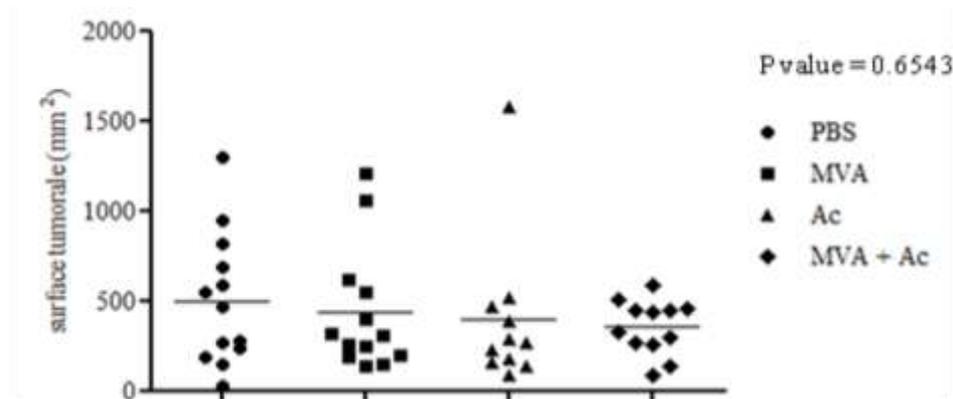
Le deuxième modèle développé est un modèle de CHC chimiquement induit par l'administration d'un carcinogène. Les différents protocoles d'immunisation testés n'ont pas permis l'obtention d'un effet thérapeutique. Dans ce modèle, la réponse des individus immunisés a été extrêmement variable au sein d'un même protocole d'immunisation. Des groupes de 10 animaux avaient pourtant été constitués de manière à contrer cette hétérogénéité.

Des précédents résultats obtenus au laboratoire et présentés dans l'annexe A montrent un effet thérapeutique notable dans ce modèle lors d'une immunisation spécifique de l'AFP (Cany et al., 2010). Dans cet essai, les animaux sont immunisés à 4 et 5 mois avec un vecteur synthétique constitué d'une faible dose d'ADN plasmidique codant pour l'AFP et complexée à un copolymère à bloc, le 704. Les animaux vaccinés présentent une diminution de 65% de la surface tumorale totale par rapport à des animaux contrôles non vaccinés.

Cependant, de façon peu explicable, il faut noter qu'une dérive de ce modèle a été observée. En effet, si l'on compare les groupes témoins PBS dans notre étude et dans l'étude publiée, le développement tumoral semble actuellement beaucoup plus rapide. En effet, la surface tumorale moyenne du groupe témoin était de  $175 \text{ mm}^2$  alors qu'elle est dans notre étude de  $740 \text{ mm}^2$  et cette dérive a été observée dans 3 expériences indépendantes réalisées depuis la publication. Ainsi, il nous est impossible de comparer les résultats obtenus dans notre étude avec l'effet thérapeutique notable obtenu lors de l'immunisation avec l'ADNmAFP/704.

Toujours sur ce modèle DEN chimiquement induit, une expérience non présentée dans la partie résultats a été menée. Le but était d'évaluer l'effet d'une injection d'anticorps agonistes du CD137 couplé à l'immunisation avec le MVA recombinant. Le CD137 est une molécule de la famille des récepteurs du TNF qui est exprimé à la surface de nombreuses cellules de l'immunité comme les cellules dendritiques, les cellules NK et NKT, les cellules T activées et les lymphocytes T régulateurs (Sun et al., 2004). Il a été montré que l'engagement du CD137 soit par le CD137 ligand soit par des anticorps agonistes conduit à la prolifération des cellules T, à la production de cytokines, à la maturation fonctionnelle et à une survie prolongée des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  activés (Hurtado et al., 1997; Pollok et al., 1993; Takahashi et al., 1999). Ainsi, l'engagement du CD137 peut constituer une stratégie intéressante dans le cadre de l'immunothérapie du cancer. Dans notre essai, les souris DEN ont reçu 5 injections à 3 semaines d'intervalle de  $5 \cdot 10^7$  pfu de MVA mAFP:TMR suivies chacune 5 jours après d'une injection par voie intrapéritonéale d'anticorps agonistes du

récepteur CD137 (100 µg pour les trois premières et 50 µg pour les 2 suivantes). L'anticorps utilisé est le clone 3H3 généreusement fourni par le Pr. R.S. Mittler (Department of Surgery and Emory Vaccine Center, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA). Au sacrifice à 8 mois, l'évaluation de la surface tumorale totale n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les groupes traités et le groupe PBS : les surfaces moyennes en mm<sup>2</sup> obtenues sont de 498±364 pour le groupe PBS, 432±342 pour le groupe MVA, 390±416 pour le groupe anticorps et 353±150 pour le groupe MVA-anticorps (**figure 92**).



**Figure 92 :** Evaluation de l'effet thérapeutique de différents protocoles d'immunisation dans le modèle DEN.

Ce résultat décevant a déjà été observé dans d'autres modèles murins de cancer. En effet, des effets thérapeutiques très variables ont été obtenus suite à l'utilisation d'anticorps agonistes du CD137 selon le site anatomique d'implantation de la tumeur et l'immunogénicité de la tumeur expérimentale. Ainsi, le traitement de souris avec des anticorps agonistes du CD137 a causé la régression de larges tumeurs bien établies incluant le sarcome Ag104A, le mastocytome P815, le lymphome EL4E7 ou le fibrosarcome B10.2 (Melero et al., 1997; Miller et al., 2002). Cependant, aucun effet anti-tumoral n'a été observé dans des tumeurs bien établies mais peu immunogènes ou dans des tumeurs métastatiques comme les mélanomes B16/D5 ou B16-F10, les tumeurs C3 ou les carcinomes pulmonaires TC-1 (Kim et al., 2001; Wilcox et al., 2002). Dans ces cas, l'échec du traitement est dû à l'ignorance immunologique de la tumeur par les CTL spécifiques de l'antigène tumoral au cours de la croissance tumorale (Wilcox et al., 2002). Ceci peut expliquer dans notre cas l'absence d'effet observé d'autant plus qu'il semble que l'engagement du CD137 ne soit pas efficace pour initier une réponse T mais plus pour stimuler l'effet des cellules immunitaires déjà activées *in vivo* par leur antigène tumoral spécifique. Or dans notre cas, les immunisations avec le MVA

mAFP:TMR ne semblent initier qu'une réponse limitée des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'AFP. Enfin, paradoxalement, il semble que les anticorps agonistes du CD137 qui permettent un rejet tumoral chez la souris sont aussi capables de supprimer l'immunité humorale (Mittler et al., 1999). Ainsi, dans notre étude, la réponse anticorps spécifique de l'AFP pourrait également être inhibée par les anticorps agonistes du CD137.

### **Conclusion générale**

Les travaux conduits au cours de mon travail de doctorat avaient pour but d'évaluer les réponses immunitaire et thérapeutique d'une immunothérapie spécifique de l'AFP et basée sur l'utilisation de vecteurs MVA recombinants. La difficulté résidait dans le fait que, cet antigène du soi étant faiblement immunogène, l'immunisation devait être suffisamment puissante pour pouvoir briser la tolérance en place.

De nombreuses stratégies ont été mises en œuvre pour surmonter cette difficulté comme l'expression par les vecteurs MVA recombinants de formes modifiées de la protéine AFP, l'utilisation de protocoles d'immunisation avec déplétion des lymphocytes T régulateurs, une approche vaccinale par prime boost avec un adénovirus ou encore un essai de xénoimmunisation avec la forme humaine de l'AFP.

Dans le cadre de la recherche d'une réponse immunitaire spécifique de l'AFP, l'absence d'outils immunologiques nous a conduits à l'utilisation d'une librairie de peptides pour la protéine murine de l'AFP. Cependant, que ce soit dans le fond H2K-k ou H2K-b, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une réponse CD4 ou CD8 spécifique, nette et reproductible. Une réponse anticorps est mise en place suite à une immunisation avec le MVA codant pour la forme transmembranaire de l'AFP. Cependant, cette réponse humorale n'est, à elle seule, pas suffisante pour obtenir un effet thérapeutique dans les deux modèles de CHC murins testés.

Les résultats présentés sont propres à notre étude et suggèrent que l'utilisation de vecteurs MVA recombinants dans le cadre d'une immunothérapie spécifique de l'AFP ne soit pas propice pour déclencher des réponses immunitaire et thérapeutique notables dans les modèles murins de CHC testés. Cependant, le potentiel thérapeutique des vecteurs MVA a été démontré dans de nombreux autres essais pré-cliniques ainsi que dans les essais cliniques en cours.

# Annexes

**ANNEXE A :**

**Effet thérapeutique d'une immunothérapie spécifique de l'AFP dans un modèle de CHC murin.**

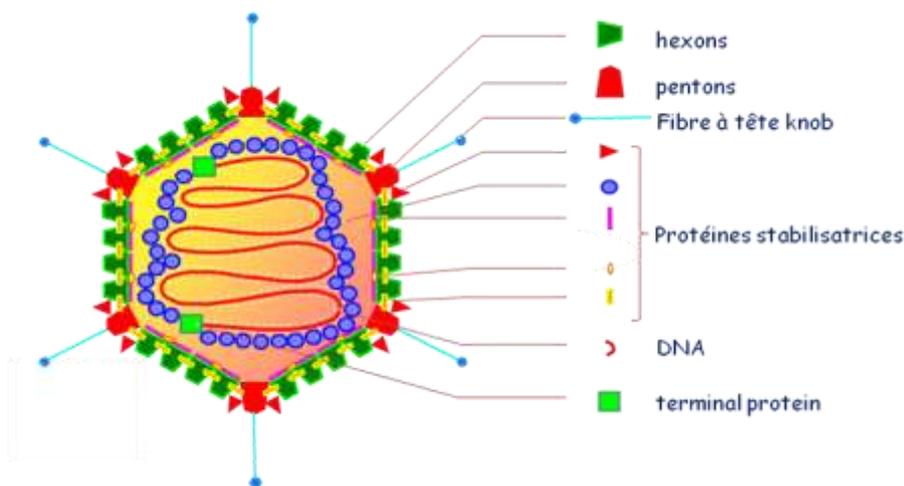
**ANNEXE B :**

**Protocole d'imagerie *in vivo* par PET-SCAN basé sur l'utilisation du symporteur NIS comme gène rapporteur.**

## ANNEXE C :

### Infection des glandes surrénales par les adénovirus de type 5.

Les adénovirus sont des virus à ADN linéaire double brin icosaédriques et non-enveloppés d'environ 120 nanomètres de diamètre. La capside virale est constituée de trois composants principaux : les hexons, les bases pentons et les fibres à tête knob (**figure 1**).

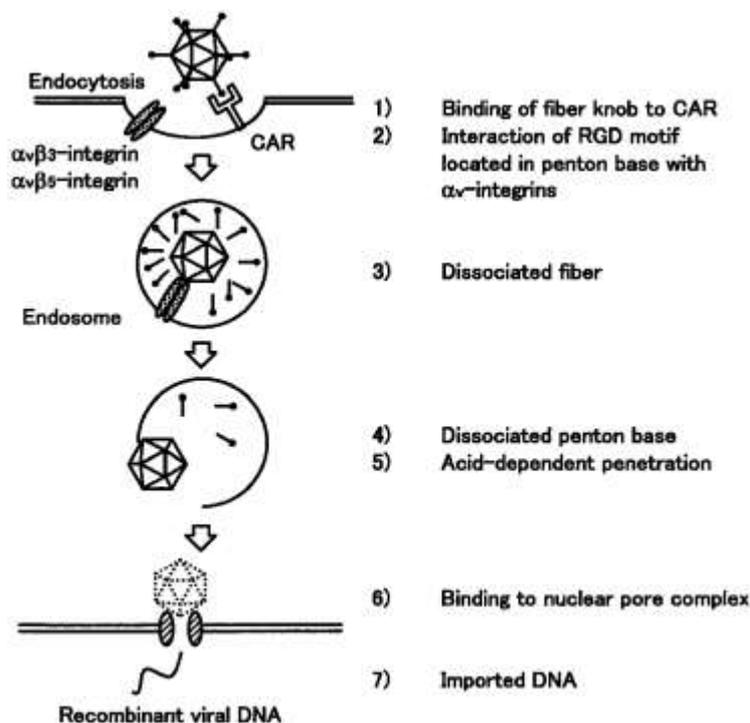


**Figure 1:** Vue schématique de la structure de l'adénovirus.

Les vecteurs adénoviraux et, notamment l'adénovirus de type 5, sont les vecteurs les plus utilisés dans les essais cliniques et les protocoles de thérapie génique. De ce fait, leur biologie, leur structure et leur génome ont été très largement étudiés. Ils sont capables d'infecter *in vitro* un très large spectre de cellules quiescentes ou en division. *In vivo*, il a été montré qu'une injection systémique d'adénovirus conduit à une transduction rapide et prédominante des hépatocytes chez les Mammifères (Alemany and Curiel, 2001; Coughlan et al., 2009; Peerlinck et al., 2009). Cependant, plusieurs études montrent que les glandes surrénales sont également transduites après une injection systémique d'adénovirus (Barzon et al., 2004; Chao et al., 1998; Groot-Wassink et al., 2002; Themis et al., 1999; Wang et al., 2003). De plus, deux études montrent qu'en tenant compte de la taille de l'organe, le niveau de transduction des glandes surrénales est du même ordre de grandeur que celui du foie (Groot-Wassink et al., 2002; Wang et al., 2003).

Il était classiquement admis que l'infection des cellules cibles par les adénovirus était un processus en deux étapes : une reconnaissance entre les fibres à tête knob et le récepteur CAR (Coxsackievirus-adénovirus receptor) dans un premier temps suivi d'une interaction

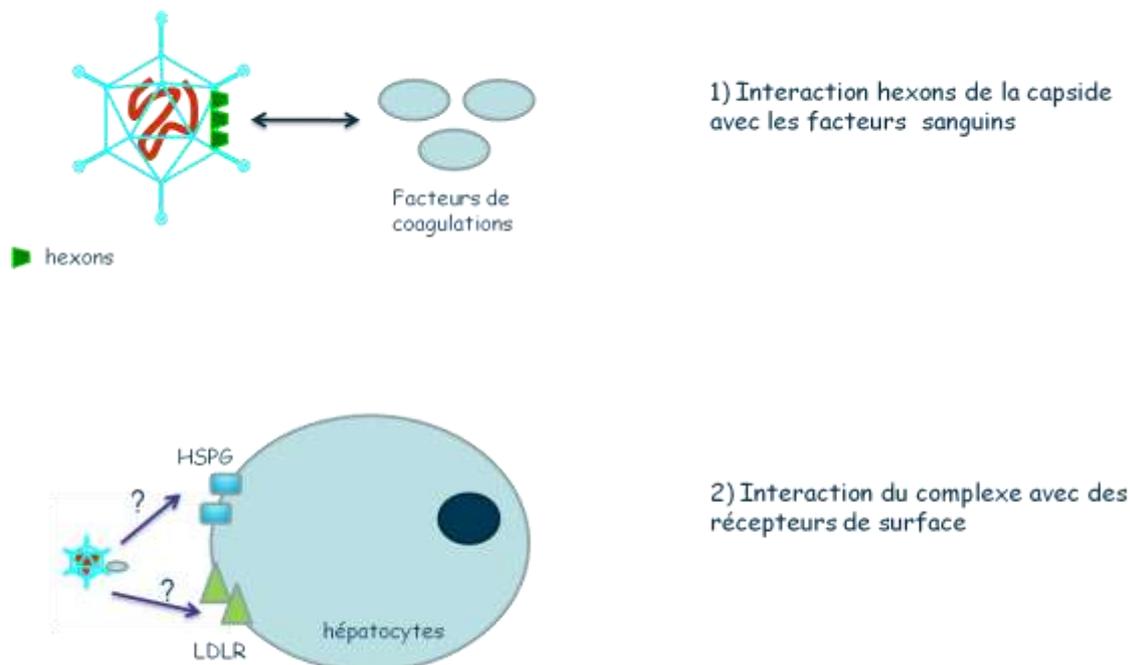
entre les bases pentons et des intégrines de surface (**figure 2**) (Bergelson et al., 1997; Wickham et al., 1993).



**Figure 2 :** Mécanisme schématique de la transduction de la cellule cible par un adénovirus. (Okada, 2001).

Ainsi, le tropisme marqué des adénovirus pour le foie semble dépendre de la forte expression du récepteur CAR considéré comme étant la protéine d'attachement cellulaire responsable de l'entrée des adénovirus de tous les sous-groupes (Roelvink et al., 1998). Cependant, l'expression de CAR dans de nombreux organes tels que le cœur, le cerveau, le pancréas, la prostate et les testicules, suggère l'existence de barrières anatomiques *in vivo* (Fechner et al., 1999). De plus, l'accessibilité du récepteur semble être un paramètre important qui peut également restreindre le nombre de tissus cibles (Cohen et al., 2001; Coyne and Bergelson, 2005).

En 2001, Alemany et Curiel démontrent que des adénovirus mutés incapables de se lier au récepteur CAR transduisent avec la même efficacité le foie (Alemany and Curiel, 2001). De nombreuses études utilisant des adénovirus avec des capsides mutées ont progressivement suggéré un nouveau mécanisme d'entrée des adénovirus dans les cellules cibles : une interaction entre les hexons de la capside virale et le facteur X sanguin permettrait la formation d'un complexe qui entrerait dans les cellules cibles après une liaison sur les récepteurs de surface aux LDL ou sur les protéoglycanes héparane-sulfate (Kalyuzhniy et al., 2008; Parker et al., 2006; Shayakhmetov et al., 2005; Vigant et al., 2008; Waddington et al., 2007; Waddington et al., 2008) (**figure 3**).



**Figure 3:** Mécanisme d'entrée possible des adénovirus dans les cellules cibles.

### **Objectif du projet :**

L'objectif est de déterminer si l'entrée de l'adénovirus de type 5 dans les glandes surrénales est un processus CAR-dépendant ou au contraire CAR-indépendant et dans ce cas, si l'entrée du vecteur est également gouverné par le nouveau consensus mettant en jeu les facteurs sanguins.

### **Résultats :**

Notre étude, présentée dans le papier joint, confirme que les cellules des glandes surrénales n'expriment pas le récepteur CAR. Ceci suggère donc que la transduction des glandes surrénales repose sur un mécanisme indépendant de CAR. Nos analyses par qPCR, par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase et par immunohistochimie démontrent qu'en présence d'un anti-coagulant, la warfarin, qui réduit le taux de facteurs sanguins circulants, l'injection systémique d'adénovirus est fortement inhibée dans les glandes surrénales. De plus, après un pré-traitement des animaux avec de la warfarin, la complémentation avec le facteur X sanguin permet de restaurer la transduction des glandes surrénales après une injection systémique des adénovirus suggérant ainsi, comme pour le foie, l'importance de ce facteur sanguin pour l'entrée du virus dans l'organe.

# Bibliographie

2008. World cancer report 2008. World health organization, International agency for research on cancer.
2009. Rethinking therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 8:685-6.
2010. OncoVEX: Promise of oncolytic immunity. *Hum Vaccin* 6.
- Acres, B. 2007. Cancer immunotherapy: phase II clinical studies with TG4010 (MVA-MUC1-IL2). *J Buon* 12 Suppl 1:S71-5.
- Acres, B., and J.Y. Bonnefoy. 2008. Clinical development of MVA-based therapeutic cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 7:889-93.
- Adams, G.P., and L.M. Weiner. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-57.
- Ahmadzadeh, M., and S.A. Rosenberg. 2005. TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 174:5215-23.
- Al-Shammaa, H.A., Y. Li, and Y. Yonemura. 2008. Current status and future strategies of cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* 14:1159-66.
- Alemany, R., and D.T. Curiel. 2001. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 8:1347-53.
- Alexia, C., G. Fallot, M. Lasfer, G. Schweizer-Groyer, and A. Groyer. 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* 68:1003-15.
- Alisa, A., A. Ives, A.A. Pathan, C.V. Navarrete, R. Williams, A. Bertoletti, and S. Behboudi. 2005. Analysis of CD4+ T-Cell responses to a novel alpha-fetoprotein-derived epitope in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 11:6686-94.
- Altenburger, W., C.P. Suter, and J. Altenburger. 1989. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch Virol* 105:15-27.
- Amara, R.R., F. Villinger, J.D. Altman, S.L. Lydy, S.P. O'Neil, S.I. Staprans, D.C. Montefiori, Y. Xu, J.G. Herndon, L.S. Wyatt, M.A. Candido, N.L. Kozyr, P.L. Earl, J.M. Smith, H.L. Ma, B.D. Grimm, M.L. Hulsey, H.M. McClure, J.M. McNicholl, B. Moss, and H.L. Robinson. 2002. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* 20:1949-55.
- Amato, R.J. 2010. 5T4-modified vaccinia Ankara: progress in tumor-associated antigen-based immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 10:281-7.
- Amato, R.J., N. Drury, S. Naylor, J. Jac, S. Saxena, A. Cao, J. Hernandez-McClain, and R. Harrop. 2008a. Vaccination of prostate cancer patients with modified vaccinia ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax): a phase 2 trial. *J Immunother* 31:577-85.
- Amato, R.J., W. Shingler, S. Naylor, J. Jac, J. Willis, S. Saxena, J. Hernandez-McClain, and R. Harrop. 2008b. Vaccination of renal cell cancer patients with modified vaccinia ankara delivering tumor antigen 5T4 (TroVax) administered with interleukin 2: a phase II trial. *Clin Cancer Res* 14:7504-10.
- Amato, R.J., W. Shingler, M. Goonewardena, J. de Belin, S. Naylor, J. Jac, J. Willis, S. Saxena, J. Hernandez-McClain, and R. Harrop. 2009. Vaccination of renal cell cancer patients with modified vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) alone or administered in combination with interferon-alpha (IFN-alpha): a phase 2 trial. *J Immunother* 32:765-72.
- Andersen, M.H., D. Schrama, P. Thor Straten, and J.C. Becker. 2006. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126:32-41.
- Anderson, R.J., and J. Schneider. 2007. Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine* 25 Suppl 2:B24-34.
- Antoine, G., F. Scheifflinger, F. Dorner, and F.G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244:365-96.
- Anzola, M. 2004. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 11:383-93.
- Appleman, L.J., and V.A. Boussiotis. 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192:161-80.
- Aptsiauri, N., T. Cabrera, R. Mendez, A. Garcia-Lora, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 2007. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 601:123-31.
- Armstrong, G.L., M.J. Alter, G.M. McQuillan, and H.S. Margolis. 2000. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 31:777-82.
- Asnacios, A., L. Fartoux, O. Romano, C. Tesmoingt, S.S. Louafi, T. Mansoubakht, P. Artru, T. Poynard, O. Rosmorduc, M. Hebbar, and J. Taieb. 2008. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter phase 2 study. *Cancer* 112:2733-9.

- Ault, K.A. 2007. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 369:1861-8.
- Avila, M.A., C. Berasain, B. Sangro, and J. Prieto. 2006. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:3866-84.
- Ayres, R.C., D.A. Robertson, K.C. Dewbury, G.H. Millward-Sadler, and C.L. Smith. 1990. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. *Gut* 31:722-4.
- Bae, J.S., S.J. Park, K.B. Park, S.Y. Paik, J.K. Ryu, C.K. Choi, and T.J. Hwang. 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* 20:80-5.
- Bafna, S., S. Kaur, and S.K. Batra. 2010. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 29:2893-904.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52.
- Banchereau, J., and A.K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306.
- Baril, P., P. Martin-Duque, and G. Vassaux. 2010. Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. *Br J Pharmacol* 159:761-71.
- Barrow-Laing, L., W. Chen, and A. Roman. 2010. Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology* 400:233-9.
- Barzon, L., M. Boscaro, and G. Palu. 2004. Endocrine aspects of cancer gene therapy. *Endocr Rev* 25:1-44.
- Bayati, N., A.L. Silverman, and S.C. Gordon. 1998. Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 93:2452-6.
- Behboudi, S., A. Alisa, S. Boswell, J. Anastassiou, A.A. Pathan, and R. Williams. 2010. Expansion of anti-AFP Th1 and Tc1 responses in hepatocellular carcinoma occur in different stages of disease. *Br J Cancer* 102:748-53.
- Benchetrit, F., A. Gazagne, O. Adotevi, N. Haicheur, B. Godard, C. Badoual, W.H. Fridman, and E. Tartour. 2003. [Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy]. *Bull Cancer* 90:677-85.
- Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet. 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10:440-7.
- Beral, V., D. Bull, J. Green, and G. Reeves. 2007. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 369:1703-10.
- Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-3.
- Bergers, G., and L.M. Coussens. 2000. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev* 10:120-7.
- Bergman, P.J. 2009. Cancer immunotherapy. *Top Companion Anim Med* 24:130-6.
- Bertagnolli, M.M. 2005. Surgical prevention of cancer. *J Clin Oncol* 23:324-32.
- Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332-7.
- Bielinska, A.U., J.F. Kukowska-Latallo, and J.R. Baker, Jr. 1997. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta* 1353:180-90.
- Bishop, J.M. 1996. The discovery of proto-oncogenes. *Faseb J* 10:362-4.
- Biswas, S., P. Trobridge, J. Romero-Gallo, D. Billheimer, L.L. Myeroff, J.K. Willson, S.D. Markowitz, and W.M. Grady. 2008. Mutational inactivation of TGFBR2 in microsatellite unstable colon cancer arises from the cooperation of genomic instability and the clonal outgrowth of transforming growth factor beta resistant cells. *Genes Chromosomes Cancer* 47:95-106.
- Black, M., A. Trent, M. Tirrell, and C. Olive. 2010. Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists. *Expert Rev Vaccines* 9:157-73.
- Bladergroen, B.A., C.J. Meijer, R.L. ten Berge, C.E. Hack, J.J. Muris, D.F. Dukers, A. Chott, Y. Kazama, J.J. Oudejans, O. van Berkum, and J.A. Kummer. 2002. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 99:232-7.
- Blanchard, T.J., A. Alcamí, P. Andrea, and G.L. Smith. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 79 ( Pt 5):1159-67.

- Blondon, H., L. Fritsch, and D. Cherqui. 2004. Two cases of spontaneous regression of multicentric hepatocellular carcinoma after intraperitoneal rupture: possible role of immune mechanisms. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16:1355-9.
- Board, R., and G.C. Jayson. 2005. Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics. *Drug Resist Updat* 8:75-83.
- Boffetta, P., and M. Hashibe. 2006. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7:149-56.
- Bolondi, L., S. Sofia, S. Siringo, S. Gaiani, A. Casali, G. Zironi, F. Piscaglia, L. Gramantieri, M. Zanetti, and M. Sherman. 2001. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 48:251-9.
- Bonilla Guerrero, R., and L.R. Roberts. 2005. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42:760-77.
- Borghaei, H., M.R. Smith, and K.S. Campbell. 2009. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol* 625:41-54.
- Bosetti, C., F. Levi, P. Boffetta, F. Lucchini, E. Negri, and C. La Vecchia. 2008. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology* 48:137-45.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829-40.
- Bouwens, L., and E. Wisse. 1992. Pit cells in the liver. *Liver* 12:3-9.
- Bricard, G., H. Bouzourene, O. Martinet, D. Rimoldi, N. Halkic, M. Gillet, P. Chaubert, H.R. Macdonald, P. Romero, J.C. Cerottini, and D.E. Speiser. 2005. Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 174:1709-16.
- Broyles, S.S. 1991. A role for ATP hydrolysis in vaccinia virus early gene transcription. Dissociation of the early transcription factor-promoter complex. *J Biol Chem* 266:15545-8.
- Butterfield, L.H. 2004. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127:S232-41.
- Butterfield, L.H., A. Ribas, D.M. Potter, and J.S. Economou. 2007. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol Immunother* 56:1931-43.
- Butterfield, L.H., A. Koh, W. Meng, C.M. Vollmer, A. Ribas, V. Dissette, E. Lee, J.A. Glaspy, W.H. McBride, and J.S. Economou. 1999. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 59:3134-42.
- Butterfield, L.H., W.S. Meng, A. Koh, C.M. Vollmer, A. Ribas, V.B. Dissette, K. Faull, J.A. Glaspy, W.H. McBride, and J.S. Economou. 2001. T cell responses to HLA-A\*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol* 166:5300-8.
- Butterfield, L.H., A. Ribas, W.S. Meng, V.B. Dissette, S. Amarnani, H.T. Vu, E. Seja, K. Todd, J.A. Glaspy, W.H. McBride, and J.S. Economou. 2003. T-cell responses to HLA-A\*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 9:5902-8.
- Butterfield, L.H., A. Ribas, V.B. Dissette, Y. Lee, J.Q. Yang, P. De la Rocha, S.D. Duran, J. Hernandez, E. Seja, D.M. Potter, W.H. McBride, R. Finn, J.A. Glaspy, and J.S. Economou. 2006. A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* 12:2817-25.
- Cairns, J. 1960. The initiation of vaccinia infection. *Virology* 11:603-23.
- Cany, J., A. Avril, V. Pichard, D. Aubert, N. Ferry, and S. Conchon. 2007. A transgenic mouse with beta-Galactosidase as a fetal liver self-antigen for immunotherapy studies. *J Hepatol* 47:396-403.
- Cany, J., B. Barteau, L. Tran, V. Gauttier, I. Archambeaud, J.P. Couty, B. Turlin, B. Pitard, G. Vassaux, N. Ferry, and S. Conchon. 2010. AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. *J Hepatol*.
- Cao, M., R. Cabrera, Y. Xu, R. Firpi, H. Zhu, C. Liu, and D.R. Nelson. 2007. Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Lab Invest* 87:582-90.
- Cao, Y. 2010. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? *Exp Cell Res* 316:1304-8.
- Capurro, M., I.R. Wanless, M. Sherman, G. Deboer, W. Shi, E. Miyoshi, and J. Filmus. 2003. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 125:89-97.
- Cardis, E., D. Krewski, M. Boniol, V. Drozdovitch, S.C. Darby, E.S. Gilbert, S. Akiba, J. Benichou, J. Ferlay, S. Gandini, C. Hill, G. Howe, A. Kesminiene, M. Moser, M. Sanchez, H. Storm, L. Voisin, and P. Boyle. 2006. Estimates of the cancer burden in Europe from radioactive fallout from the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 119:1224-35.
- Cardis, E., M. Vrijheid, M. Blettner, E. Gilbert, M. Hakama, C. Hill, G. Howe, J. Kaldor, C.R. Muirhead, M. Schubauer-Berigan, T. Yoshimura, F. Bermann, G. Cowper, J. Fix, C. Hacker, B. Heinmiller, M. Marshall, I. Thierry-Chef, D. Utterback, Y.O. Ahn, E. Amoros, P. Ashmore, A. Auvinen, J.M. Bae, J.B. Solano, A. Biau, E. Combalot, P. Deboodt, A. Diez Sacristan, M. Eklof, H. Engels, G. Engholm, G.

- Gulis, R. Habib, K. Holan, H. Hyvonen, A. Kerekes, J. Kurtinaitis, H. Malaker, M. Martuzzi, A. Mastauskas, A. Monnet, M. Moser, M.S. Pearce, D.B. Richardson, F. Rodriguez-Artalejo, A. Rogel, H. Tardy, M. Telle-Lamberton, I. Turai, M. Usel, and K. Veress. 2005. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *Bmj* 331:77.
- Cariani, E., C. Lasserre, D. Seurin, B. Hamelin, F. Kemeny, D. Franco, M.P. Czech, A. Ullrich, and C. Brechot. 1988. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res* 48:6844-9.
- Carroll, M. 2003. The relevance of basic sciences learning objectives to clinical practice. *Med Educ* 37:946-7.
- Celluzzi, C.M., J.I. Mayordomo, W.J. Storkus, M.T. Lotze, and L.D. Falo, Jr. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183:283-7.
- Chajes, V., A.C. Thiebaut, M. Rotival, E. Gauthier, V. Maillard, M.C. Boutron-Ruault, V. Joulin, G.M. Lenoir, and F. Clavel-Chapelon. 2008. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol* 167:1312-20.
- Chang, L., A. Kaipainen, and J. Folkman. 2002. Lymphangiogenesis new mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 979:111-9.
- Chao, J., J.J. Zhang, K.F. Lin, and L. Chao. 1998. Human kallikrein gene delivery attenuates hypertension, cardiac hypertrophy, and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hum Gene Ther* 9:21-31.
- Chemin, I., and F. Zoulim. 2009. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 286:52-9.
- Chen, D.S., and J.L. Sung. 1979. Relationship of hepatitis B surface antigen to serum alpha-fetoprotein in nonmalignant diseases of the liver. *Cancer* 44:984-92.
- Chen, M., P. Tabaczewski, S.M. Truscott, L. Van Kaer, and I. Stroynowski. 2005a. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. *J Immunol* 175:1047-55.
- Chen, Y.L., P.Y. Law, and H.H. Loh. 2005b. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5:575-89.
- Chen, Y.T., M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A.O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, and L.J. Old. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-8.
- Chevret, S., J.C. Trinchet, D. Mathieu, A.A. Rached, M. Beaugrand, and C. Chastang. 1999. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. *J Hepatol* 31:133-41.
- Chiu, C.T., T.S. Yeh, J.C. Hsu, and M.F. Chen. 2003. Expression of Bcl-2 family modulated through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 48:670-6.
- Chomez, P., O. De Backer, M. Bertrand, E. De Plaen, T. Boon, and S. Lucas. 2001. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 61:5544-51.
- Chou, C.K., J.Y. Hung, J.C. Liu, C.T. Chen, and M.C. Hung. 2006. An attenuated Salmonella oral DNA vaccine prevents the growth of hepatocellular carcinoma and colon cancer that express alpha-fetoprotein. *Cancer Gene Ther* 13:746-52.
- Christ, M., B. Louis, F. Stoeckel, A. Dieterle, L. Grave, D. Dreyer, J. Kintz, D. Ali Hadji, M. Lusky, and M. Mehtali. 2000. Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther* 11:415-27.
- Clemente, C.G., M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini, and N. Cascinelli. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303-10.
- Cohen, C.J., J.T. Shieh, R.J. Pickles, T. Okegawa, J.T. Hsieh, and J.M. Bergelson. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15191-6.
- Collazos, J., J. Genolla, and A. Ruibal. 1992. Preliminary study of alpha-fetoprotein in nonmalignant liver diseases. A clinico-biochemical evaluation. *Int J Biol Markers* 7:97-102.
- Collier, L.H. 1955. The development of a stable smallpox vaccine. *J Hyg (Lond)* 53:76-101.
- Collins, I., and M.D. Garrett. 2005. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 5:366-73.
- Conry, R.M., D.T. Curiel, T.V. Strong, S.E. Moore, K.O. Allen, D.L. Barlow, D.R. Shaw, and A.F. LoBuglio. 2002. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 8:2782-7.
- Coughlan, L., S. Vallath, A. Saha, M. Flak, I.A. McNeish, G. Vassaux, J.F. Marshall, I.R. Hart, and G.J. Thomas. 2009. In vivo retargeting of adenovirus type 5 to alphavbeta6 integrin results in reduced hepatotoxicity and improved tumor uptake following systemic delivery. *J Virol* 83:6416-28.

- Coyne, C.B., and J.M. Bergelson. 2005. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 57:869-82.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-9.
- De Souza, A.T., G.R. Hankins, M.K. Washington, R.L. Fine, T.C. Orton, and R.L. Jirtle. 1995. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 10:1725-9.
- Deng, L., M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada, and H. Hotta. 2006. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* 87:1703-13.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, R. Mortarini, P. Baldassari, A. Guidetti, G.F. Gallino, M. Del Vecchio, F. Ravagnani, M. Magni, P. Chaplin, N. Cascinelli, G. Parmiani, A.M. Gianni, and A. Anichini. 2004. Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34(+)-derived dendritic cell vaccination: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 10:5381-90.
- Dienes, H.P., T. Hutteroth, G. Hess, and S.C. Meuer. 1987. Immunoelectron microscopic observations on the inflammatory infiltrates and HLA antigens in hepatitis B and non-A, non-B. *Hepatology* 7:1317-25.
- Doherty, D.G., S. Norris, L. Madrigal-Estebas, G. McEntee, O. Traynor, J.E. Hegarty, and C. O'Farrelly. 1999. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163:2314-21.
- Donato, F., P. Boffetta, and M. Puoti. 1998. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 75:347-54.
- Donato, F., A. Tagger, U. Gelatti, G. Parrinello, P. Boffetta, A. Albertini, A. Decarli, P. Trevisi, M.L. Ribero, C. Martelli, S. Porru, and G. Nardi. 2002. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 155:323-31.
- dos Santos, N.R., R. Torensma, T.J. de Vries, M.W. Schreurs, D.R. de Bruijn, E. Kater-Baats, D.J. Ruiter, G.J. Adema, G.N. van Muijen, and A.G. van Kessel. 2000. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 60:1654-62.
- Douglas, S.D., and R.A. Musson. 1986. Phagocytic defects--monocytes/macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 40:62-8.
- Draper, S.J., and J.L. Heeney. 2010. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol* 8:62-73.
- Drexler, I., C. Staib, and G. Sutter. 2004. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol* 15:506-12.
- Drexler, I., K. Heller, B. Wahren, V. Erfle, and G. Sutter. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* 79 ( Pt 2):347-52.
- Drexler, I., E. Antunes, M. Schmitz, T. Wolfel, C. Huber, V. Erfle, P. Rieber, M. Theobald, and G. Sutter. 1999. Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A\*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 59:4955-63.
- Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau. 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J Gen Virol* 85:2167-75.
- Dudich, E., L. Semenkova, I. Dudich, E. Gorbatova, N. Tochtamisheva, E. Tatulov, M. Nikolaeva, and G. Sukhikh. 1999. alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases. *Eur J Biochem* 266:750-61.
- Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-4.
- Duffy, M.J. 2001. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 47:624-30.
- Dunlap, D.D., A. Maggi, M.R. Soria, and L. Monaco. 1997. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 25:3095-101.
- Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6:836-48.

- Durazo, F.A., L.M. Blatt, W.G. Corey, J.H. Lin, S. Han, S. Saab, R.W. Busuttill, and M.J. Tong. 2008. Des-gamma-carboxyprothrombin, alpha-fetoprotein and AFP-L3 in patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1541-8.
- El-Serag, H.B., and K.L. Rudolph. 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132:2557-76.
- El Hage, F., S. Abouzahr-Rifai, F. Meslin, F. Mami-Chouaib, and S. Chouaib. 2008. [Immune response and cancer]. *Bull Cancer* 95:57-67.
- Engelmayer, J., M. Larsson, M. Subklewe, A. Chahroudi, W.I. Cox, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163:6762-8.
- Ercolini, A.M., B.H. Ladle, E.A. Manning, L.W. Pfannenstiel, T.D. Armstrong, J.P. Machiels, J.G. Bieler, L.A. Emens, R.T. Reilly, and E.M. Jaffee. 2005. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 201:1591-602.
- Espenschied, J., J. Lamont, J. Longmate, S. Pendas, Z. Wang, D.J. Diamond, and J.D. Ellenhorn. 2003. CTLA-4 blockade enhances the therapeutic effect of an attenuated poxvirus vaccine targeting p53 in an established murine tumor model. *J Immunol* 170:3401-7.
- Evdokimova, V.N., and L.H. Butterfield. 2008. Alpha-fetoprotein and other tumour-associated antigens for immunotherapy of hepatocellular cancer. *Expert Opin Biol Ther* 8:325-36.
- Fagnoni, F.F., A. Zerbini, G. Pelosi, and G. Missale. 2008. Combination of radiofrequency ablation and immunotherapy. *Front Biosci* 13:369-81.
- Fay, J.W., A.K. Palucka, S. Paczesny, M. Dhodapkar, D.A. Johnston, S. Burkeholder, H. Ueno, and J. Banchereau. 2006. Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 55:1209-18.
- Fechner, H., A. Haack, H. Wang, X. Wang, K. Eizema, M. Pauschinger, R. Schoemaker, R. Veghel, A. Houtsmuller, H.P. Schultheiss, J. Lamers, and W. Poller. 1999. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 6:1520-35.
- Feitelson, M.A., J. Pan, and Z. Lian. 2004. Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surg Clin North Am* 84:339-54.
- Ferlay, J., H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D.M. Parkin. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
- Fernandez, A.F., and M. Esteller. 2010. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene* 29:1405-20.
- Fields, A.C., G. Cotsonis, D. Sexton, R. Santoianni, and C. Cohen. 2004. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod Pathol* 17:1378-85.
- Filmus, J. 2001. Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* 11:19R-23R.
- Fischer, U., and K. Schulze-Osthoff. 2005. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1:942-61.
- Fisk, B., T.L. Blevins, J.T. Wharton, and C.G. Ioannides. 1995. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 181:2109-17.
- Fiszer, D., and M. Kurpisz. 1998. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am J Reprod Immunol* 40:172-6.
- Flaherty, K.T., and G. McArthur. 2010. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer*.
- Flores, Y.N., H.F. Yee, Jr., M. Leng, J.J. Escarce, R. Bastani, J. Salmeron, and L.S. Morales. 2008. Risk factors for chronic liver disease in Blacks, Mexican Americans, and Whites in the United States: results from NHANES IV, 1999-2004. *Am J Gastroenterol* 103:2231-8.
- Freeman, A.J., G.J. Dore, M.G. Law, M. Thorpe, J. Von Overbeck, A.R. Lloyd, G. Marinos, and J.M. Kaldor. 2001. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 34:809-16.
- Fujiwara, K., T. Higashi, K. Nouse, H. Nakatsukasa, Y. Kobayashi, M. Uemura, S. Nakamura, S. Sato, T. Hanafusa, Y. Yumoto, I. Naito, and Y. Shiratori. 2004. Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 19:1121-7.
- Gandini, S., E. Botteri, S. Iodice, M. Boniol, A.B. Lowenfels, P. Maisonneuve, and P. Boyle. 2008. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 122:155-64.
- Gao, Q., X.Y. Wang, S.J. Qiu, I. Yamato, M. Sho, Y. Nakajima, J. Zhou, B.Z. Li, Y.H. Shi, Y.S. Xiao, Y. Xu, and J. Fan. 2009. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 15:971-9.

- Gasteiger, G., W. Kastenmuller, R. Ljapoci, G. Sutter, and I. Drexler. 2007. Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines. *J Virol* 81:11925-36.
- Gati, A., G. Dorothee, J. Thiery, N. Guerra, C. Richon, C. Gaudin, F. Mami-Chouaib, A. Caignard, M. Diarra-Mehrpour, and S. Chouaib. 2003. [Tumor/cytotoxic effector cross-talk in the control of tumor susceptibility to lysis]. *Bull Cancer* 90:686-94.
- Gherardi, M.M., and M. Esteban. 1999. Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 17:1074-83.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-32.
- Giles, R.H., J.H. van Es, and H. Clevers. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653:1-24.
- Gollob, J.A., S. Wilhelm, C. Carter, and S.L. Kelley. 2006. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol* 33:392-406.
- Gomez, C.E., J.L. Najera, E. Domingo-Gil, L. Ochoa-Callejero, G. Gonzalez-Aseguinolaza, and M. Esteban. 2007. Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J Gen Virol* 88:2473-8.
- Gong, Y., A. Hounsa, S. Egal, P.C. Turner, A.E. Sutcliffe, A.J. Hall, K. Cardwell, and C.P. Wild. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ Health Perspect* 112:1334-8.
- Graham, B.S., R.A. Koup, M. Roederer, R.T. Bailer, M.E. Enama, Z. Moodie, J.E. Martin, M.M. McCluskey, B.K. Chakrabarti, L. Lamoreaux, C.A. Andrews, P.L. Gomez, J.R. Mascola, and G.J. Nabel. 2006. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J Infect Dis* 194:1650-60.
- Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy. 2006. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 45:868-78.
- Grimm, C.F., D. Ortmann, L. Mohr, S. Michalak, T.U. Krohne, S. Meckel, S. Eisele, J. Encke, H.E. Blum, and M. Geissler. 2000. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 119:1104-12.
- Groot-Wassink, T., E.O. Aboagye, M. Glaser, N.R. Lemoine, and G. Vassaux. 2002. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression in vivo by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. *Hum Gene Ther* 13:1723-35.
- Gulley, J., A.P. Chen, W. Dahut, P.M. Arlen, A. Bastian, S.M. Steinberg, K. Tsang, D. Panicali, D. Poole, J. Schlom, and J. Michael Hamilton. 2002. Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate* 53:109-17.
- Hainaut, P., and M. Hollstein. 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77:81-137.
- Hampel, H. 2009. Genetic testing for hereditary colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 18:687-703.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanke, P., M. Serwe, F. Dombrowski, T. Sauerbruch, and W.H. Caselmann. 2002a. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 9:346-55.
- Hanke, P., C. Rabe, M. Serwe, S. Bohm, C. Pagenstecher, T. Sauerbruch, and W.H. Caselmann. 2002b. Cirrhotic patients with or without hepatocellular carcinoma harbour AFP-specific T-lymphocytes that can be activated in vitro by human alpha-fetoprotein. *Scand J Gastroenterol* 37:949-55.
- Harada, T., K. Shigeta, K. Noda, Y. Fukumoto, H. Nishimura, M. Mizuta, and T. Takemoto. 1980. Clinical implications of alpha-fetoprotein in liver cirrhosis: five-year follow-up study. *Hepatogastroenterology* 27:169-75.
- Hareuveni, M., C. Gautier, M.P. Kieny, D. Wreschner, P. Chambon, and R. Lathe. 1990. Vaccination against tumor cells expressing breast cancer epithelial tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9498-502.
- Harrop, R., J. John, and M.W. Carroll. 2006a. Recombinant viral vectors: cancer vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 58:931-47.
- Harrop, R., M.G. Ryan, K.A. Myers, I. Redchenko, S.M. Kingsman, and M.W. Carroll. 2006b. Active treatment of murine tumors with a highly attenuated vaccinia virus expressing the tumor associated antigen 5T4 (TroVax) is CD4+ T cell dependent and antibody mediated. *Cancer Immunol Immunother* 55:1081-90.
- Harrop, R., N. Connolly, I. Redchenko, J. Valle, M. Saunders, M.G. Ryan, K.A. Myers, N. Drury, S.M. Kingsman, R.E. Hawkins, and M.W. Carroll. 2006c. Vaccination of colorectal cancer patients with modified vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 12:3416-24.
- Harrop, R., N. Drury, W. Shingler, P. Chikoti, I. Redchenko, M.W. Carroll, S.M. Kingsman, S. Naylor, A. Melcher, J. Nicholls, H. Wassan, N. Habib, and A. Anthoney. 2007. Vaccination of colorectal cancer

- patients with modified vaccinia ankara encoding the tumor antigen 5T4 (TroVax) given alongside chemotherapy induces potent immune responses. *Clin Cancer Res* 13:4487-94.
- Hasegawa, K., and N. Kokudo. 2009. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 39:833-43.
- Hassan, M.M., A. Frome, Y.Z. Patt, and H.B. El-Serag. 2002. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol* 35:266-9.
- Hayflick, L. 1980. Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev* 14:59-79.
- He, B. 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* 13:393-403.
- He, Y., H. Nakao, S.L. Tan, S.J. Polyak, P. Neddermann, S. Vijaysri, B.L. Jacobs, and M.G. Katze. 2002. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 76:9207-17.
- Hengge, U.R., E.F. Chan, R.A. Foster, P.S. Walker, and J.C. Vogel. 1995. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat Genet* 10:161-6.
- Herkel, J., B. Jagemann, C. Wiegand, J.F. Lazaro, S. Lueth, S. Kanzler, M. Blessing, E. Schmitt, and A.W. Lohse. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* 37:1079-85.
- Hingorani, M., C.L. White, S. Zaidi, H.S. Pandha, A.A. Melcher, S.A. Bhide, C.M. Nutting, K.N. Syrigos, R.G. Vile, G. Vassaux, and K.J. Harrington. 2010. Therapeutic effect of sodium iodide symporter gene therapy combined with external beam radiotherapy and targeted drugs that inhibit DNA repair. *Mol Ther* 18:1599-605.
- Hippo, Y., K. Watanabe, A. Watanabe, Y. Midorikawa, S. Yamamoto, S. Ihara, S. Tokita, H. Iwanari, Y. Ito, K. Nakano, J. Nezu, H. Tsunoda, T. Yoshino, I. Ohizumi, M. Tsuchiya, S. Ohnishi, M. Makuuchi, T. Hamakubo, T. Kodama, and H. Aburatani. 2004. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 64:2418-23.
- Hirsch, F.R., M. Varella-Garcia, and F. Cappuzzo. 2009. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 28 Suppl 1:S32-7.
- Hochstein-Mintzel, V., T. Hanichen, H.C. Huber, and H. Stickl. 1975. [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 230:283-97.
- Hodge, J.W., J. Higgins, and J. Schlom. 2009. Harnessing the unique local immunostimulatory properties of modified vaccinia Ankara (MVA) virus to generate superior tumor-specific immune responses and antitumor activity in a diversified prime and boost vaccine regimen. *Vaccine* 27:4475-82.
- Hodge, J.W., D.J. Poole, W.M. Aarts, A. Gomez Yafal, L. Gritz, and J. Schlom. 2003. Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res* 63:7942-9.
- Hodi, F.S., M.C. Mihm, R.J. Soiffer, F.G. Haluska, M. Butler, M.V. Seiden, T. Davis, R. Henry-Spires, S. MacRae, A. Willman, R. Padera, M.T. Jaklitsch, S. Shankar, T.C. Chen, A. Korman, J.P. Allison, and G. Dranoff. 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4712-7.
- Holt, S.E., and J.W. Shay. 1999. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180:10-8.
- Holterman, L., R. Vogels, R. van der Vlugt, M. Sieuwerts, J. Grimbergen, J. Kaspers, E. Geelen, E. van der Helm, A. Lemckert, G. Gillissen, S. Verhaagh, J. Custers, D. Zuijdgheest, B. Berkhout, M. Bakker, P. Quax, J. Goudsmit, and M. Havenga. 2004. Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol* 78:13207-15.
- Hoption Cann, S.A., J.P. van Netten, and C. van Netten. 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 79:672-80.
- Hoshida, Y., S.M. Nijman, M. Kobayashi, J.A. Chan, J.P. Brunet, D.Y. Chiang, A. Villanueva, P. Newell, K. Ikeda, M. Hashimoto, G. Watanabe, S. Gabriel, S.L. Friedman, H. Kumada, J.M. Llovet, and T.R. Golub. 2009. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69:7385-92.
- Hruby, D.E., and L.A. Ball. 1982. Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *J Virol* 43:403-9.
- Hu, K.Q., N.L. Kyulo, N. Lim, B. Elhazin, D.J. Hillebrand, and T. Bock. 2004. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 99:860-5.
- Hu, T.H., C.C. Huang, P.R. Lin, H.W. Chang, L.P. Ger, Y.W. Lin, C.S. Changchien, C.M. Lee, and M.H. Tai. 2003. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97:1929-40.

- Huang, K., and S. Lin. 2000. Nationwide vaccination: a success story in Taiwan. *Vaccine* 18 Suppl 1:S35-8.
- Hung, C.F., T.C. Wu, A. Monie, and R. Roden. 2008. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunol Rev* 222:43-69.
- Hurtado, J.C., Y.J. Kim, and B.S. Kwon. 1997. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158:2600-9.
- Huynh, H., T.T. Nguyen, K.H. Chow, P.H. Tan, K.C. Soo, and E. Tran. 2003. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 3:19.
- Hwang, Y.H., J.Y. Choi, S. Kim, E.S. Chung, T. Kim, S.S. Koh, B. Lee, S.H. Bae, J. Kim, and Y.M. Park. 2004. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 29:113-121.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. 2005. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* 54:1127-36.
- Ikeda, H., B. Lethé, F. Lehmann, N. van Baren, J.F. Baurain, C. de Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon, and P.G. Coulie. 1997. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6:199-208.
- Imbeaud, S., Y. Ladeiro, and J. Zucman-Rossi. 2010. Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 30:75-86.
- Irshad, M., I. Dhar, and Y.K. Joshi. 2006. Significance of hepatitis C virus core protein in the diagnosis of hepatitis C virus infection in different liver diseases. *J Investig Med* 54:478-83.
- Ishikawa, T. 2010. Clinical features of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 16:2463-7.
- Javerzat, S., P. Auguste, and A. Bikfalvi. 2002. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* 8:483-9.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277-300.
- Jenne, L., C. Hauser, J.F. Arrighi, J.H. Saurat, and A.W. Hugin. 2000. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther* 7:1575-83.
- Ji, F., W. Wang, Z.L. Xia, Y.J. Zheng, Y.L. Qiu, F. Wu, W.B. Miao, R.F. Jin, J. Qian, L. Jin, Y.L. Zhu, and D.C. Christiani. 2010. Prevalence and persistence of chromosomal damage and susceptible genotypes of metabolic and DNA repair genes in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Carcinogenesis* 31:648-53.
- Johnson, P.J. 2001. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 5:145-59.
- Joklik, W.K., and Y. Becker. 1964. The Replication and Coating of Vaccinia DNA. *J Mol Biol* 10:452-74.
- Jonkers, J., and A. Berns. 2002. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2:251-65.
- Kalland, K.H., X.S. Ke, and A.M. Oyan. 2009. Tumour virology--history, status and future challenges. *Apmis* 117:382-99.
- Kalyuzhniy, O., N.C. Di Paolo, M. Silvestry, S.E. Hofherr, M.A. Barry, P.L. Stewart, and D.M. Shayakhmetov. 2008. Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5483-8.
- Kamp, D.W. 2009. Asbestos-induced lung diseases: an update. *Transl Res* 153:143-52.
- Kannangai, R., J. Wang, Q.Z. Liu, F. Sahin, and M. Torbenson. 2005. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation. *Int J Gastrointest Cancer* 35:53-60.
- Kaposi-Novak, P., J.S. Lee, L. Gomez-Quiroz, C. Coulouarn, V.M. Factor, and S.S. Thorgeirsson. 2006. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 116:1582-95.
- Kastenmuller, W., I. Drexler, H. Ludwig, V. Erfle, C. Peschel, H. Bernhard, and G. Sutter. 2006. Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. *Virology* 350:276-88.
- Kaufman, H., J. Schlom, and J. Kantor. 1991. A recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen (CEA). *Int J Cancer* 48:900-7.
- Kaufman, H.L., and S.D. Bines. 2010. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 6:941-9.
- Kay, M.A., J.C. Glorioso, and L. Naldini. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33-40.
- Kazerounian, S., K.O. Yee, and J. Lawler. 2008. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65:700-12.
- Kedl, R.M., J.W. Kappler, and P. Marrack. 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr Opin Immunol* 15:120-7.
- Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe. 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19:309-14.

- Kennedy, R.B., I.G. Ovsyannikova, R.M. Jacobson, and G.A. Poland. 2009. The immunology of smallpox vaccines. *Curr Opin Immunol* 21:314-20.
- Key, T.J., P.K. Verkasalo, and E. Banks. 2001. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2:133-40.
- Key, T.J., P.N. Appleby, G.K. Reeves, and A.W. Roddam. 2010. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol* 11:530-42.
- Khalade, A., M.S. Jaakkola, E. Pukkala, and J.J. Jaakkola. 2010. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health* 9:31.
- Khong, H.T., and N.P. Restifo. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
- Killion, J.J., R. Radinsky, and I.J. Fidler. 1998. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17:279-84.
- Kim, J.A., B.J. Averbook, K. Chambers, K. Rothchild, J. Kjaergaard, R. Papay, and S. Shu. 2001. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer Res* 61:2031-7.
- Kim, S.R., M. Kudo, O. Hino, K.H. Han, Y.H. Chung, and H.S. Lee. 2008. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan and Korea. A review. *Oncology* 75 Suppl 1:13-6.
- Kirk, G.D., O.A. Lesi, M. Mendy, K. Szymanska, H. Whittle, J.J. Goedert, P. Hainaut, and R. Montesano. 2005. 249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 24:5858-67.
- Knolle, P.A., E. Schmitt, S. Jin, T. Germann, R. Duchmann, S. Hegenbarth, G. Gerken, and A.W. Lohse. 1999. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116:1428-40.
- Kobayashi, N., N. Hiraoka, W. Yamagami, H. Ojima, Y. Kanai, T. Kosuge, A. Nakajima, and S. Hirohashi. 2007. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 13:902-11.
- Kobayashi, Y., T. Higashi, K. Nouse, H. Nakatsukasa, M. Ishizaki, T. Kaneyoshi, N. Toshikuni, K. Kariyama, E. Nakayama, and T. Tsuji. 2000. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 32:612-7.
- Koido, S., M. Kashiwaba, D. Chen, S. Gendler, D. Kufe, and J. Gong. 2000. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 165:5713-9.
- Koido, S., E. Hara, S. Homma, Y. Namiki, T. Ohkusa, J. Gong, and H. Tajiri. 2009. Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells. *Clin Dev Immunol* 2009:657369.
- Komori, H., T. Nakatsura, S. Senju, Y. Yoshitake, Y. Motomura, Y. Ikuta, D. Fukuma, K. Yokomine, M. Harao, T. Beppu, M. Matsui, T. Torigoe, N. Sato, H. Baba, and Y. Nishimura. 2006. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:2689-97.
- Kondoh, N., A. Hada, A. Ryo, M. Shuda, M. Arai, O. Matsubara, F. Kimura, T. Wakatsuki, and M. Yamamoto. 2003. Activation of Galectin-1 gene in human hepatocellular carcinoma involves methylation-sensitive complex formations at the transcriptional upstream and downstream elements. *Int J Oncol* 23:1575-83.
- Korangy, F., L.A. Ormandy, J.S. Bleck, J. Klempnauer, L. Wilkens, M.P. Manns, and T.F. Greten. 2004. Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:4332-41.
- Lagiou, P., H.O. Adami, and D. Trichopoulos. 2005. Causality in cancer epidemiology. *Eur J Epidemiol* 20:565-74.
- Lan, K.H., M.L. Sheu, S.J. Hwang, S.H. Yen, S.Y. Chen, J.C. Wu, Y.J. Wang, N. Kato, M. Omata, F.Y. Chang, and S.D. Lee. 2002. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21:4801-11.
- Landowski, T.H., N. Qu, I. Buyuksal, J.S. Painter, and W.S. Dalton. 1997. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90:4266-70.
- Larrea, E., J.I. Riezu-Boj, L. Gil-Guerrero, N. Casares, R. Aldabe, P. Sarobe, M.P. Civeira, J.L. Heeney, C. Rollier, B. Verstrepen, T. Wakita, F. Borrás-Cuesta, J.J. Lasarte, and J. Prieto. 2007. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 81:3662-6.
- Lee, J.W., Y.H. Soung, S.Y. Kim, H.W. Lee, W.S. Park, S.W. Nam, S.H. Kim, J.Y. Lee, N.J. Yoo, and S.H. Lee. 2005. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 24:1477-80.
- Leenders, M.W., M.W. Nijkamp, and I.H. Borel Rinkes. 2008. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. *World J Gastroenterol* 14:6915-23.
- Leicht, D.T., V. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, L. Kaplun, M. Dobson, and G. Tzivion. 2007. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773:1196-212.

- Lencioni, R.A., H.P. Allgaier, D. Cioni, M. Olschewski, P. Deibert, L. Crocetti, H. Frings, J. Laubenberger, I. Zuber, H.E. Blum, and C. Bartolozzi. 2003. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 228:235-40.
- Leung, T.W., A.M. Tang, B. Zee, W.Y. Lau, P.B. Lai, K.L. Leung, J.T. Lau, S.C. Yu, and P.J. Johnson. 2002. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer* 94:1760-9.
- Li, M., X. Liu, S. Zhou, P. Li, and G. Li. 2005a. Effects of alpha fetoprotein on escape of Bel 7402 cells from attack of lymphocytes. *BMC Cancer* 5:96.
- Li, M.S., P.F. Li, S.P. He, G.G. Du, and G. Li. 2002a. The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *World J Gastroenterol* 8:469-75.
- Li, M.S., P.F. Li, F.Y. Yang, S.P. He, G.G. Du, and G. Li. 2002b. The intracellular mechanism of alpha-fetoprotein promoting the proliferation of NIH 3T3 cells. *Cell Res* 12:151-6.
- Li, M.S., Q.L. Ma, Q. Chen, X.H. Liu, P.F. Li, G.G. Du, and G. Li. 2005b. Alpha-fetoprotein triggers hepatoma cells escaping from immune surveillance through altering the expression of Fas/FasL and tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand and its receptor of lymphocytes and liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 11:2564-9.
- Lian, Z., J. Liu, M. Wu, H.Y. Wang, P. Arbuthnot, M. Kew, and M.A. Feitelson. 2007. Hepatitis B x antigen up-regulates vascular endothelial growth factor receptor 3 in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 45:1390-9.
- Lin, H., R. Huber, D. Schlessinger, and P.J. Morin. 1999. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 59:807-10.
- Lin, S.M., C.J. Lin, C.C. Lin, C.W. Hsu, and Y.C. Chen. 2004. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm. *Gastroenterology* 127:1714-23.
- Lindsey, K.R., L. Gritz, R. Sherry, A. Abati, P.A. Fetsch, L.C. Goldfeder, M.I. Gonzales, K.A. Zinnack, L. Rogers-Freezer, L. Haworth, S.A. Mavroukakis, D.E. White, S.M. Steinberg, N.P. Restifo, D.L. Panicali, S.A. Rosenberg, and S.L. Topalian. 2006. Evaluation of prime/boost regimens using recombinant poxvirus/tyrosinase vaccines for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 12:2526-37.
- listed, N.a. 1994. Predictive factors for long term prognosis after partial hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Cancer* 74:2772-80.
- Liu, B., A.M. Woltman, H.L. Janssen, and A. Boonstra. 2009. Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *J Leukoc Biol* 85:205-14.
- Liu, L., R. Chavan, and M.B. Feinberg. 2008. Dendritic cells are preferentially targeted among hematolymphocytes by Modified Vaccinia Virus Ankara and play a key role in the induction of virus-specific T cell responses in vivo. *BMC Immunol* 9:15.
- Liu, M.A., and J.B. Ulmer. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet* 55:25-40.
- Liu, Y., S. Daley, V.N. Evdokimova, D.D. Zdobinski, D.M. Potter, and L.H. Butterfield. 2006. Hierarchy of alpha fetoprotein (AFP)-specific T cell responses in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *J Immunol* 177:712-21.
- Liu, Y.C., C.J. Chen, H.S. Wu, D.C. Chan, J.C. Yu, A.H. Yang, Y.L. Cheng, S.C. Lee, and H.J. Harn. 2004. Telomerase and c-myc expression in hepatocellular carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 30:384-90.
- Llovet, J.M., and J. Bruix. 2000. Prospective validation of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 32:679-80.
- Llovet, J.M., and J. Bruix. 2008. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 48 Suppl 1:S20-37.
- Llovet, J.M., C. Bru, and J. Bruix. 1999. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 19:329-38.
- Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix. 2003. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362:1907-17.
- Llovet, J.M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T.F. Greten, P.R. Galle, J.F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, and J. Bruix. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359:378-90.
- Lohse, A.W., P.A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken, and K.H. Meyer Zum Buschenfelde. 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 110:1175-81.

- Lonardo, F., E. Di Marco, C.R. King, J.H. Pierce, O. Segatto, S.A. Aaronson, and P.P. Di Fiore. 1990. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol* 2:992-1003.
- Lucas, S., and P.G. Coulie. 2008. About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin Immunol* 20:301-7.
- Lund, P., D. Schubert, F. Niketeghad, and P. Schirmacher. 2004. Autocrine inhibition of chemotherapy response in human liver tumor cells by insulin-like growth factor-II. *Cancer Lett* 206:85-96.
- Luo, D.Z., D. Vermijlen, B. Ahishali, V. Triantis, G. Plakoutsi, F. Braet, K. Vanderkerken, and E. Wisse. 2000. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol* 6:1-11.
- Luo, G., S. Huang, X. Xie, E. Stockert, Y.T. Chen, B. Kubuschok, and M. Pfreundschuh. 2002. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun* 2:11.
- Mackett, M., G.L. Smith, and B. Moss. 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49:857-64.
- Maemura, K., Q. Zheng, T. Wada, M. Ozaki, S. Takao, T. Aikou, G.B. Bulkley, A.S. Klein, and Z. Sun. 2005. Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol* 83:336-43.
- Marrero, J.A., R.J. Fontana, S. Fu, H.S. Conjeevaram, G.L. Su, and A.S. Lok. 2005. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42:218-24.
- Mas, V.R., D.G. Maluf, K.J. Archer, K.C. Yanek, and R.A. Fisher. 2007. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation* 84:1262-71.
- Matar, P., L. Alaniz, V. Rozados, J.B. Aquino, M. Malvicini, C. Atorrasagasti, M. Gidekel, M. Silva, O.G. Scharovsky, and G. Mazzolini. 2009. Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *J Biomed Sci* 16:30.
- Matsui, M., S. Machida, T. Itani-Yohda, and T. Akatsuka. 2002. Downregulation of the proteasome subunits, transporter, and antigen presentation in hepatocellular carcinoma, and their restoration by interferon-gamma. *J Gastroenterol Hepatol* 17:897-907.
- Matsuno, K., H. Nomiya, H. Yoneyama, and R. Uwatoku. 2002. Kupffer cell-mediated recruitment of dendritic cells to the liver crucial for a host defense. *Dev Immunol* 9:143-9.
- Matsuzaki, K. 2009. Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 14:2923-34.
- Mavaddat, N., A.C. Antoniou, D.F. Easton, and M. Garcia-Closas. 2010. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol*.
- Mayr, A., H. Stickl, H.K. Muller, K. Danner, and H. Singer. 1978. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol B* 167:375-90.
- Mazzaferro, V., E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito, and L. Gennari. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693-9.
- McIlroy, D., B. Barteau, J. Cany, P. Richard, C. Gourden, S. Conchon, and B. Pitard. 2009. DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres promote low-dose DNA vaccination. *Mol Ther* 17:1473-81.
- Medema, J.P., J. de Jong, L.T. Peltenburg, E.M. Verdegaal, A. Gorter, S.A. Bres, K.L. Franken, M. Hahne, J.P. Albar, C.J. Melief, and R. Offringa. 2001. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11515-20.
- Melero, I., S. Hervas-Stubbs, M. Glennie, D.M. Pardoll, and L. Chen. 2007. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 7:95-106.
- Melero, I., W.W. Shuford, S.A. Newby, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, K.E. Hellstrom, R.S. Mittler, and L. Chen. 1997. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3:682-5.
- Melief, C.J., and S.H. van der Burg. 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8:351-60.
- Meng, W.S., L.H. Butterfield, A. Ribas, V.B. Dissette, J.B. Heller, G.A. Miranda, J.A. Glaspy, W.H. McBride, and J.S. Economou. 2001. alpha-Fetoprotein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 61:8782-6.
- Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72 ( Pt 5):1031-8.
- Meyer, R.G., C.M. Britten, U. Siepmann, B. Petzold, T.A. Sagban, H.A. Lehr, B. Weigle, M. Schmitz, L. Mateo, B. Schmidt, H. Bernhard, T. Jakob, R. Hein, G. Schuler, B. Schuler-Thurner, S.N. Wagner, I. Drexler, G. Sutter, N. Arndtz, P. Chaplin, J. Metz, A. Enk, C. Huber, and T. Wolfel. 2005. A phase I vaccination

- study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr). *Cancer Immunol Immunother* 54:453-67.
- Miller, R.E., J. Jones, T. Le, J. Whitmore, N. Boiani, B. Gliniak, and D.H. Lynch. 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* 169:1792-800.
- Mittler, R.S., T.S. Bailey, K. Klussman, M.D. Trailsmith, and M.K. Hoffmann. 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* 190:1535-40.
- Miura, N., I. Horikawa, A. Nishimoto, H. Ohmura, H. Ito, S. Hirohashi, J.W. Shay, and M. Oshimura. 1997. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 93:56-62.
- Miura, N., Y. Maeda, T. Kanbe, H. Yazama, Y. Takeda, R. Sato, T. Tsukamoto, E. Sato, A. Marumoto, T. Harada, A. Sano, Y. Kishimoto, Y. Hirooka, Y. Murawaki, J. Hasegawa, and G. Shiota. 2005. Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:3205-9.
- Mizejewski, G.J., and R. MacColl. 2003. Alpha-fetoprotein growth inhibitory peptides: potential leads for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2:1243-55.
- Mizukoshi, E., Y. Nakamoto, H. Tsuji, T. Yamashita, and S. Kaneko. 2006a. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 118:1194-204.
- Mizukoshi, E., Y. Nakamoto, Y. Marukawa, K. Arai, T. Yamashita, H. Tsuji, K. Kuzushima, M. Takiguchi, and S. Kaneko. 2006b. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43:1284-94.
- Morgan, R.A., M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, M.S. Hughes, J.C. Yang, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.L. Topalian, U.S. Kammula, N.P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C.R. de Vries, L.J. Rogers-Freezer, S.A. Mavroukakis, and S.A. Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-9.
- Mornex, F., N. Girard, C. Beziat, A. Kubas, M. Khodri, C. Trepo, and P. Merle. 2006. Feasibility and efficacy of high-dose three-dimensional-conformal radiotherapy in cirrhotic patients with small-size hepatocellular carcinoma non-eligible for curative therapies--mature results of the French Phase II RTF-1 trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66:1152-8.
- Moserle, L., A. Amadori, and S. Indraccolo. 2009. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. *Curr Mol Med* 9:935-41.
- Moss, B. 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11341-8.
- Moss, B., G.L. Smith, J.L. Gerin, and R.H. Purcell. 1984. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 311:67-9.
- Mou, D.C., S.L. Cai, J.R. Peng, Y. Wang, H.S. Chen, X.W. Pang, X.S. Leng, and W.F. Chen. 2002. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 86:110-6.
- Munn, D.H. 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* 18:220-5.
- Muntoni, A., and R.R. Reddel. 2005. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R191-6.
- Murakami, Y., K. Saigo, H. Takashima, M. Minami, T. Okanoue, C. Brechot, and P. Paterlini-Brechot. 2005. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 54:1162-8.
- Nakanishi, K., M. Sakamoto, S. Yamasaki, S. Todo, and S. Hirohashi. 2005. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103:307-12.
- Nakatsura, T., and Y. Nishimura. 2005. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19:71-7.
- Nakatsura, T., Y. Yoshitake, S. Senju, M. Monji, H. Komori, Y. Motomura, S. Hosaka, T. Beppu, T. Ishiko, H. Kamohara, H. Ashihara, T. Katagiri, Y. Furukawa, S. Fujiyama, M. Ogawa, Y. Nakamura, and Y. Nishimura. 2003. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306:16-25.
- Narod, S.A., and K. Offit. 2005. Prevention and management of hereditary breast cancer. *J Clin Oncol* 23:1656-63.
- Nattermann, J., H. Zimmermann, A. Iwan, M. von Lilienfeld-Toal, L. Leifeld, H.D. Nischalke, B. Langhans, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 2006. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* 44:945-54.

- Nemunaitis, J., T. Meyers, N. Senzer, C. Cunningham, H. West, E. Vallieres, S. Anthony, S. Vukelja, B. Berman, H. Tully, B. Pappen, S. Sarmiento, R. Arzaga, S. Duniho, S. Engardt, M. Meagher, and M.A. Cheever. 2006. Phase I Trial of sequential administration of recombinant DNA and adenovirus expressing L523S protein in early stage non-small-cell lung cancer. *Mol Ther* 13:1185-91.
- Nestle, F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-32.
- Neuveut, C., Y. Wei, and M.A. Buendia. 2010. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 52:594-604.
- Nguyen, D.X., and J. Massague. 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8:341-52.
- Nishikawa, H., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127:759-67.
- Nordenstedt, H., D.L. White, and H.B. El-Serag. 2010. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 42 Suppl 3:S206-14.
- Ogilvie, J.B., and E. Kebebew. 2006. Indication and timing of thyroid surgery for patients with hereditary medullary thyroid cancer syndromes. *J Natl Compr Canc Netw* 4:139-47.
- Okada, N. 2001. [Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors]. *Yakugaku Zasshi* 121:593-600.
- Okuda, K., T. Ohtsuki, H. Obata, M. Tomimatsu, N. Okazaki, H. Hasegawa, Y. Nakajima, and K. Ohnishi. 1985. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 56:918-28.
- Paavonen, J., P. Naud, J. Salmeron, C.M. Wheeler, S.N. Chow, D. Apter, H. Kitchener, X. Castellsague, J.C. Teixeira, S.R. Skinner, J. Hedrick, U. Jaisamrarn, G. Limson, S. Garland, A. Szarewski, B. Romanowski, F.Y. Aoki, T.F. Schwarz, W.A. Poppe, F.X. Bosch, D. Jenkins, K. Hardt, T. Zahaf, D. Descamps, F. Struyf, M. Lehtinen, G. Dubin, and M. Greenacre. 2009. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 374:301-14.
- Pages, F., J. Galon, M.C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautes-Fridman, and W.H. Fridman. 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29:1093-102.
- Palmowski, M.J., E.M. Choi, I.F. Hermans, S.C. Gilbert, J.L. Chen, U. Gileadi, M. Salio, A. Van Pel, S. Man, E. Bonin, P. Liljestrom, P.R. Dunbar, and V. Cerundolo. 2002. Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol* 168:4391-8.
- Palucka, A.K., H. Ueno, J. Connolly, F. Kerneis-Norvell, J.P. Blanck, D.A. Johnston, J. Fay, and J. Banchereau. 2006. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 29:545-57.
- Paoletti, E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11349-53.
- Papetti, M., and I.M. Herman. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C947-70.
- Pardoll, D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807-39.
- Parker, A.L., S.N. Waddington, C.G. Nicol, D.M. Shayakhmetov, S.M. Buckley, L. Denby, G. Kemball-Cook, S. Ni, A. Lieber, J.H. McVey, S.A. Nicklin, and A.H. Baker. 2006. Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes. *Blood* 108:2554-61.
- Parkin, D.M. 2004. International variation. *Oncogene* 23:6329-40.
- Parkin, D.M. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-44.
- Parmiani, G., L. Rivoltini, G. Andreola, and M. Carrabba. 2000. Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett* 74:41-4.
- Pasquini, S., S. Peralta, E. Missiaglia, L. Carta, and N.R. Lemoine. 2002. Prime-boost vaccines encoding an intracellular idioype/GM-CSF fusion protein induce protective cell-mediated immunity in murine pre-B cell leukemia. *Gene Ther* 9:503-10.
- Pastoret, P.P., and A. Vanderplasschen. 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26:343-55.
- Peck, A.B., R.A. Murgita, and H. Wigzell. 1982. Cellular and genetic restrictions in the immunoregulatory activity of alpha-fetoprotein. III. Role of the MLC-stimulating cell population in alpha-fetoprotein-induced suppression of T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 128:1134-40.
- Peerlinck, I., A. Merron, P. Baril, S. Conchon, P. Martin-Duque, C. Hindorf, J. Burnet, M. Quintanilla, M. Hingorani, R. Iggo, N.R. Lemoine, K. Harrington, and G. Vassaux. 2009. Targeted radionuclide therapy using a Wnt-targeted replicating adenovirus encoding the Na/I symporter. *Clin Cancer Res* 15:6595-601.

- Pellegatta, S., P.L. Poliani, D. Corno, F. Menghi, F. Ghielmetti, B. Suarez-Merino, V. Caldera, S. Nava, M. Ravanini, F. Facchetti, M.G. Bruzzone, and G. Finocchiaro. 2006. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res* 66:10247-52.
- Peng, J.R., H.S. Chen, D.C. Mou, J. Cao, X. Cong, L.L. Qin, L. Wei, X.S. Leng, Y. Wang, and W.F. Chen. 2005. Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett* 219:223-32.
- Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P. Johnson, E.K. Norton, and E. Paoletti. 1991. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* 180:406-10.
- Philip, P.A., M.R. Mahoney, C. Allmer, J. Thomas, H.C. Pitot, G. Kim, R.C. Donehower, T. Fitch, J. Picus, and C. Erlichman. 2005. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 23:6657-63.
- Pichard, V., P.J. Royer, C. Richou, E. Cauchin, K. Goebes, A. Gaignerie, C. Masliah, J. Gournay, M. Gregoire, and N. Ferry. 2008. Detection, isolation, and characterization of alpha-fetoprotein-specific T cell populations and clones using MHC class I multimer magnetic sorting. *J Immunother* 31:246-53.
- Pietras, K., and A. Ostman. 2010. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316:1324-31.
- Pihko, H., and E. Ruoslahti. 1973. High level of alpha-fetoprotein in sera of adult mice. *Int J Cancer* 12:354-60.
- Plank, C., K. Mechtler, F.C. Szoka, Jr., and E. Wagner. 1996. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 7:1437-46.
- Pollak, M.N., E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4:505-18.
- Pollok, K.E., Y.J. Kim, Z. Zhou, J. Hurtado, K.K. Kim, R.T. Pickard, and B.S. Kwon. 1993. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 150:771-81.
- Poon, R.T., J.W. Ho, C.S. Tong, C. Lau, I.O. Ng, and S.T. Fan. 2004. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 91:1354-60.
- Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca, and M. Rusnati. 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:159-78.
- Quasar Collaborative, G., R. Gray, J. Barnwell, C. McConkey, R.K. Hills, N.S. Williams, and D.J. Kerr. 2007. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370:2020-9.
- Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54-62.
- Rainov, N.G. 2000. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 11:2389-401.
- Ramirez, J.C., M.M. Gherardi, and M. Esteban. 2000a. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol* 74:923-33.
- Ramirez, J.C., M.M. Gherardi, D. Rodriguez, and M. Esteban. 2000b. Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. *J Virol* 74:7651-5.
- Ramlau, R., E. Quoix, J. Rolski, M. Pless, H. Lena, E. Levy, M. Krzakowski, D. Hess, E. Tartour, M.P. Chenard, J.M. Limacher, N. Bizouarne, B. Acres, C. Halluard, and T. Velu. 2008. A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-II2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3:735-44.
- Randolph, A.C., E.M. Tharalson, and N. Gilani. 2008. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma is possible and might have implications for future therapies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:804-9.
- Raza, S.A., G.M. Clifford, and S. Franceschi. 2007. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 96:1127-34.
- Reits, E.A., J.W. Hodge, C.A. Herberts, T.A. Groothuis, M. Chakraborty, E.K. Wansley, K. Camphausen, R.M. Luiten, A.H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F.A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J.J. Neefjes. 2006. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 203:1259-71.
- Rehnan, A.G., M. Tyson, M. Egger, R.F. Heller, and M. Zwahlen. 2008. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569-78.
- Restifo, N.P., F. Esquivel, Y. Kawakami, J.W. Yewdell, J.J. Mule, S.A. Rosenberg, and J.R. Bennink. 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177:265-72.

- Rey, J., D. Olive, G. Sebahoun, T. O'Callaghan, and R.T. Costello. 2005. [New insights into cytotoxic effector cells]. *Bull Cancer* 92:935-43.
- Reynolds, S.R., A. Zeleniuch-Jacquotte, R.L. Shapiro, D.F. Roses, M.N. Harris, D. Johnston, and J.C. Bystryn. 2003. Vaccine-induced CD8+ T-cell responses to MAGE-3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 9:657-62.
- Reynolds, S.R., E. Celis, A. Sette, R. Oratz, R.L. Shapiro, D. Johnston, M. Fotino, and J.C. Bystryn. 1998. HLA-independent heterogeneity of CD8+ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MC1R, and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients. *J Immunol* 161:6970-6.
- Ritter, M., M.Y. Ali, C.F. Grimm, R. Weth, L. Mohr, W.O. Bocher, K. Endrulat, H. Wedemeyer, H.E. Blum, and M. Geissler. 2004. Immunoregulation of dendritic and T cells by alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41:999-1007.
- Roberts, L.R., and G.J. Gores. 2005. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 25:212-25.
- Rodriguez, M.M., S.M. Ryu, C. Qian, M. Geissler, C. Grimm, J. Prieto, H.E. Blum, and L. Mohr. 2008. Immunotherapy of murine hepatocellular carcinoma by alpha-fetoprotein DNA vaccination combined with adenovirus-mediated chemokine and cytokine expression. *Hum Gene Ther* 19:753-9.
- Roelvink, P.W., A. Lizonova, J.G. Lee, Y. Li, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, D.E. Brough, I. Kovessi, and T.J. Wickham. 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72:7909-15.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-15.
- Rosenberg, S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, and M.E. Dudley. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8:299-308.
- Rosenberg, S.A., B.S. Packard, P.M. Aebersold, D. Solomon, S.L. Topalian, S.T. Toy, P. Simon, M.T. Lotze, J.C. Yang, C.A. Seipp, and et al. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319:1676-80.
- Rosenberg, S.A., Y. Zhai, J.C. Yang, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M. Marincola, S.L. Topalian, N.P. Restifo, C.A. Seipp, J.H. Einhorn, B. Roberts, and D.E. White. 1998a. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90:1894-900.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M. Marincola, S.L. Topalian, N.P. Restifo, M.E. Dudley, S.L. Schwarz, P.J. Spiess, J.R. Wunderlich, M.R. Parkhurst, Y. Kawakami, C.A. Seipp, J.H. Einhorn, and D.E. White. 1998b. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321-7.
- Rossmann, W., and R. Schulte-Hermann. 2001. Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech* 52:430-6.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, N.W. Zwirner, M.A. Toscano, J.M. Ilarregui, A. Bravo, J. Mordoh, L. Fainboim, O.L. Podhajcer, and G.A. Rabinovich. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5:241-51.
- Ruoslahti, E., and M. Seppala. 1979. alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv Cancer Res* 29:275-346.
- Saeki, A., K. Nakao, Y. Nagayama, K. Yanagi, K. Matsumoto, T. Hayashi, H. Ishikawa, K. Hamasaki, N. Ishii, and K. Eguchi. 2004. Diverse efficacy of vaccination therapy using the alpha-fetoprotein gene against mouse hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 13:111-6.
- Sagawa, T., Y. Yamada, M. Takahashi, Y. Sato, M. Kobune, R. Takimoto, J. Fukaura, S. Iyama, T. Sato, K. Miyanishi, T. Matsunaga, T. Takayama, J. Kato, K. Sasaki, H. Hamada, and Y. Niitsu. 2008. Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53, and 5-fluorouracil in mice. *Hepatology* 48:828-40.
- Sahin, F., R. Kannangai, O. Adegbola, J. Wang, G. Su, and M. Torbenson. 2004. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 10:8421-5.
- Santamaria, D., and S. Ortega. 2006. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci* 11:1164-88.
- Schalk, J.A., F.R. Mooi, G.A. Berbers, L.A. van Aerts, H. Ovelgonne, and T.G. Kimman. 2006. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. *Hum Vaccin* 2:45-53.
- Schirmacher, P., W.A. Held, D. Yang, F.V. Chisari, Y. Rustum, and C.E. Rogler. 1992. Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res* 52:2549-56.
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25.

- Schmitt, C.A., J.S. Fridman, M. Yang, E. Baranov, R.M. Hoffman, and S.W. Lowe. 2002. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1:289-98.
- Schmitz, K.J., J. Wohlschlaeger, H. Lang, G.C. Sotiropoulos, M. Malago, K. Steveling, H. Reis, V.R. Cicinnati, K.W. Schmid, and H.A. Baba. 2008. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 48:83-90.
- Schneider, J., S.C. Gilbert, C.M. Hannan, P. Degano, E. Prieur, E.G. Sheu, M. Plebanski, and A.V. Hill. 1999. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol Rev* 170:29-38.
- Schneider, J., S.C. Gilbert, T.J. Blanchard, T. Hanke, K.J. Robson, C.M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, G.L. Smith, and A.V. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4:397-402.
- Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M.F. Bachmann, and P.S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17:829-74.
- Semela, D., and J.F. Dufour. 2004. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41:864-80.
- Seyfried, T.N., and L.M. Shelton. 2010. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 7:7.
- Shay, J.W., and W.E. Wright. 2006. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov* 5:577-84.
- Shayakhmetov, D.M., A. Gaggar, S. Ni, Z.Y. Li, and A. Lieber. 2005. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* 79:7478-91.
- Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-67.
- Shepard, C.W., E.P. Simard, L. Finelli, A.E. Fiore, and B.P. Bell. 2006. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 28:112-25.
- Sherman, L.A., T.A. Burke, and J.A. Biggs. 1992. Extracellular processing of peptide antigens that bind class I major histocompatibility molecules. *J Exp Med* 175:1221-6.
- Shi, F., M. Shi, Z. Zeng, R.Z. Qi, Z.W. Liu, J.Y. Zhang, Y.P. Yang, P. Tien, and F.S. Wang. 2010. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*.
- Shimamura, T., S. Saito, K. Morita, T. Kitamura, M. Morimoto, T. Kiba, K. Numata, K. Tanaka, and H. Sekihara. 2000. Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 15:640-6.
- Smith, C.L., F. Mirza, V. Paschetto, D.C. Tschärke, M.J. Palmowski, P.R. Dunbar, A. Sette, A.L. Harris, and V. Cerundolo. 2005a. Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. *J Immunol* 175:8431-7.
- Smith, C.L., P.R. Dunbar, F. Mirza, M.J. Palmowski, D. Shepherd, S.C. Gilbert, P. Coulie, J. Schneider, E. Hoffman, R. Hawkins, A.L. Harris, and V. Cerundolo. 2005b. Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int J Cancer* 113:259-66.
- Smith, G.L., and A. Vanderplasschen. 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol* 440:395-414.
- Smith, G.L., M. Mackett, and B. Moss. 1983a. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 302:490-5.
- Smith, G.L., B.R. Murphy, and B. Moss. 1983b. Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:7155-9.
- Smith, G.L., A. de Carlos, and Y.S. Chan. 1989. Vaccinia virus encodes a thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *Nucleic Acids Res* 17:7581-90.
- Smyth, M.J., E. Cretney, M.H. Kershaw, and Y. Hayakawa. 2004. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 202:275-93.
- Sojka, D.K., M. Donepudi, J.A. Bluestone, and M.B. Mokyr. 2000. Melphalan and other anticancer modalities up-regulate B7-1 gene expression in tumor cells. *J Immunol* 164:6230-6.
- Sokol, R.J. 2002. Liver cell injury and fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35 Suppl 1:S7-10.
- Song, E., J. Chen, N. Ouyang, F. Su, M. Wang, and U. Heemann. 2001. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer* 85:1047-54.
- Song, G.Y., G. Gibson, W. Haq, E.C. Huang, T. Srivasta, M. Hollstein, P. Daftarian, Z. Wang, D. Diamond, and J.D. Ellenhorn. 2007. An MVA vaccine overcomes tolerance to human p53 in mice and humans. *Cancer Immunol Immunother* 56:1193-205.

- Soresi, M., C. Magliarisi, P. Campagna, G. Leto, G. Bonfissuto, A. Riili, A. Carroccio, R. Sesti, S. Tripi, and G. Montalto. 2003. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 23:1747-53.
- Srinivasan, R., and J.D. Wolchok. 2004. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. *J Transl Med* 2:12.
- Sripa, B., S. Kaewkes, P. Sithithaworn, E. Mairiang, T. Laha, M. Smout, C. Pairojkul, V. Bhudhisawasdi, S. Tesana, B. Thinkamrop, J.M. Bethony, A. Loukas, and P.J. Brindley. 2007. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* 4:e201.
- Stark, G.R., and W.R. Taylor. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32:227-48.
- Steffan, A.M., J.L. Gendrault, R.S. McCuskey, P.A. McCuskey, and A. Kirn. 1986. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 6:830-6.
- Steinman, R.M., and J. Banchereau. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419-26.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Stickel, F., D. Schuppan, E.G. Hahn, and H.K. Seitz. 2002. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut* 51:132-9.
- Stockl, L., A. Berting, B. Malkowski, R. Foerste, P.H. Hofschneider, and E. Hildt. 2003. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* 22:2604-10.
- Sullivan, N.J., A. Sanchez, P.E. Rollin, Z.Y. Yang, and G.J. Nabel. 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408:605-9.
- Sumimoto, H., F. Imabayashi, T. Iwata, and Y. Kawakami. 2006. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 203:1651-6.
- Sun, Y., J.H. Chen, and Y. Fu. 2004. Immunotherapy with agonistic anti-CD137: two sides of a coin. *Cell Mol Immunol* 1:31-6.
- Sutter, G., and B. Moss. 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10847-51.
- Sutter, G., and B. Moss. 1995. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand* 84:195-200.
- Taieb, J., J.C. Barbare, and P. Rougier. 2006. Medical treatments for hepatocellular carcinoma (HCC): what's next? *Ann Oncol* 17 Suppl 10:x308-14.
- Taieb, J., J.C. Barbare, T. Boussaha, A.S. Cunha, T. Baere, O. Rosmorduc, J. Zucman-Rossi, and D. Franco. 2009. [Management of hepatocellular carcinoma. Where are we now? What's next?]. *Bull Cancer* 96:19-34.
- Takahashi, C., R.S. Mittler, and A.T. Vella. 1999. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162:5037-40.
- Takeda, Y., H. Togashi, H. Shinzawa, S. Miyano, R. Ishii, T. Karasawa, Y. Takeda, T. Saito, K. Saito, H. Haga, T. Matsuo, M. Aoki, H. Mitsuhashi, H. Watanabe, and T. Takahashi. 2000. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. *J Gastroenterol Hepatol* 15:1079-86.
- Taketa, K., S. Okada, N. Win, N.K. Hlaing, and K.M. Wind. 2002. Evaluation of tumor markers for the detection of hepatocellular carcinoma in Yangon General Hospital, Myanmar. *Acta Med Okayama* 56:317-20.
- Talwalkar, J.A., and G.J. Gores. 2004. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127:S126-32.
- Tamori, A., Y. Yamanishi, S. Kawashima, M. Kanehisa, M. Enomoto, H. Tanaka, S. Kubo, S. Shiomi, and S. Nishiguchi. 2005. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 11:5821-6.
- 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* 27:155-9.
- Tan, X.H., Q. Zhu, C. Liu, X.L. Liu, X.T. Shao, and B. Wei. 2006. [Immunization with dendritic cells infected with human AFP adenovirus vector effectively elicits immunity against mouse hepatocellular carcinomas]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 28:13-6.
- Tangkijvanich, P., N. Anukularnkusol, P. Suwangoon, S. Lertmaharit, O. Hanvivatvong, P. Kullavanijaya, and Y. Poovorawan. 2000. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 31:302-8.
- Tartaglia, J., W.I. Cox, S. Pincus, and E. Paoletti. 1994. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev Biol Stand* 82:125-9.
- Tartaglia, J., M.E. Perkus, J. Taylor, E.K. Norton, J.C. Audonnet, W.I. Cox, S.W. Davis, J. van der Hoeven, B. Meignier, M. Riviere, and et al. 1992. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188:217-32.

- Tatsumi, T., T. Takehara, T. Kanto, T. Miyagi, N. Kuzushita, Y. Sugimoto, M. Jinushi, A. Kasahara, Y. Sasaki, M. Hori, and N. Hayashi. 2001. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61:7563-7.
- Tengelsen, L.A., M.B. Slabaugh, J.K. Bibler, and D.E. Hruby. 1988. Nucleotide sequence and molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus. *Virology* 164:121-31.
- Terasaki, T., K. Hanazaki, E. Shiohara, Y. Matsunaga, N. Koide, and J. Amano. 2000. Complete disappearance of recurrent hepatocellular carcinoma with peritoneal dissemination and splenic metastasis: a unique clinical course after surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 15:327-30.
- Themis, M., H. Schneider, T. Kiserud, T. Cook, S. Adebakin, S. Jezzard, S. Forbes, M. Hanson, A. Pavirani, C. Rodeck, and C. Coutelle. 1999. Successful expression of beta-galactosidase and factor IX transgenes in fetal and neonatal sheep after ultrasound-guided percutaneous adenovirus vector administration into the umbilical vein. *Gene Ther* 6:1239-48.
- Thomas, M.B., and J.L. Abbruzzese. 2005. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 23:8093-108.
- Tian, G., J.L. Yi, and P. Xiong. 2004a. Specific cellular immunity and antitumor responses in C57BL/6 mice induced by DNA vaccine encoding murine AFP. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:440-3.
- Tian, G., J.L. Yi, and P. Xiong. 2004b. Antitumor immunopreventive effect in mice induced by DNA vaccine encoding a fusion protein of alpha-fetoprotein and CTLA4. *World J Gastroenterol* 10:200-4.
- Tilney, N.L., R.L. Kirkman, A.D. Whittemore, and R.T. Osteen, Jr. 1986. Vascular access for dialysis and cancer chemotherapy. *Adv Surg* 19:221-70.
- Timm, A., C. Enzinger, E. Felder, and P. Chaplin. 2006. Genetic stability of recombinant MVA-BN. *Vaccine* 24:4618-21.
- Ting, J.P., and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-33.
- Trinchet, J.C., and N. Ganne-Carrie. 2006. [Should we screen for hepatocellular carcinoma?]. *Gastroenterol Clin Biol* 30:880-6.
- Tsai, W.L., and R.T. Chung. 2010. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 29:2309-24.
- Tsugane, S. 2005. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci* 96:1-6.
- Turner, P.C., S.E. Moore, A.J. Hall, A.M. Prentice, and C.P. Wild. 2003. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect* 111:217-20.
- Turner, P.C., A. Sylla, Y.Y. Gong, M.S. Diallo, A.E. Sutcliffe, A.J. Hall, and C.P. Wild. 2005. Reduction in exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in west Africa: a community-based intervention study. *Lancet* 365:1950-6.
- Ueki, T., J. Fujimoto, T. Suzuki, H. Yamamoto, and E. Okamoto. 1997. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25:862-6.
- Ugurel, S., G. Rapp, W. Tilgen, and U. Reinhold. 2001. Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 7:1282-6.
- Um, S.H., C. Mulhall, A. Alisa, A.R. Ives, J. Karani, R. Williams, A. Bertolotti, and S. Behboudi. 2004. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *J Immunol* 173:1772-8.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-7.
- Vermijlen, D., D. Luo, C.J. Froelich, J.P. Medema, J.A. Kummer, E. Willems, F. Braet, and E. Wisse. 2002. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *J Leukoc Biol* 72:668-76.
- Vesselinovich, S.D. 1980. Infant mouse as a sensitive bioassay system for carcinogenicity of N-nitroso compounds. *IARC Sci Publ*:645-55.
- Vesselinovich, S.D., and N. Mihailovich. 1983. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res* 43:4253-9.
- Vesselinovich, S.D., M. Koka, N. Mihailovich, and K.V. Rao. 1984. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 108:60-5.
- Vigant, F., D. Descamps, B. Jullienne, S. Esselin, E. Connault, P. Opolon, T. Tordjmann, E. Vigne, M. Perricaudet, and K. Benihoud. 2008. Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver. *Mol Ther* 16:1474-80.
- Villanueva, A., D.Y. Chiang, P. Newell, J. Peix, S. Thung, C. Alsinet, V. Tovar, S. Roayaie, B. Minguez, M. Sole, C. Battiston, S. Van Laarhoven, M.I. Fiel, A. Di Feo, Y. Hoshida, S. Yea, S. Toffanin, A. Ramos, J.A. Martignetti, V. Mazzaferro, J. Bruix, S. Waxman, M. Schwartz, M. Meyerson, S.L. Friedman, and J.M. Llovet. 2008. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 135:1972-83, 1983 e1-11.

- Vinas, O., R. Bataller, P. Sancho-Bru, P. Gines, C. Berenguer, C. Enrich, J.M. Nicolas, G. Ercilla, T. Gallart, J. Vives, V. Arroyo, and J. Rodes. 2003. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 38:919-29.
- Vollmer, C.M., Jr., F.C. Eilber, L.H. Butterfield, A. Ribas, V.B. Dissette, A. Koh, L.D. Montejo, M.C. Lee, K.J. Andrews, W.H. McBride, J.A. Glaspy, and J.S. Economou. 1999. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 59:3064-7.
- von Boehmer, H. 2005. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* 5:571-7.
- Vonderheide, R.H., W.C. Hahn, J.L. Schultze, and L.M. Nadler. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 10:673-9.
- Wada, Y., O. Nakashima, R. Kutami, O. Yamamoto, and M. Kojiro. 1998. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 27:407-14.
- Waddington, S.N., A.L. Parker, M. Havenga, S.A. Nicklin, S.M. Buckley, J.H. McVey, and A.H. Baker. 2007. Targeting of adenovirus serotype 5 (Ad5) and 5/47 pseudotyped vectors in vivo: fundamental involvement of coagulation factors and redundancy of CAR binding by Ad5. *J Virol* 81:9568-71.
- Waddington, S.N., J.H. McVey, D. Bhella, A.L. Parker, K. Barker, H. Atoda, R. Pink, S.M. Buckley, J.A. Greig, L. Denby, J. Custers, T. Morita, I.M. Francischetti, R.Q. Monteiro, D.H. Barouch, N. van Rooijen, C. Napoli, M.J. Havenga, S.A. Nicklin, and A.H. Baker. 2008. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132:397-409.
- Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, and H. Yu. 2004a. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54.
- Wang, X.P., G.Z. Liu, A.L. Song, H.Y. Li, and Y. Liu. 2004b. Antitumor immunity induced by DNA vaccine encoding alpha-fetoprotein/heat shock protein 70. *World J Gastroenterol* 10:3197-200.
- Wang, X.W., and B. Xu. 1998. Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. *Int J Cancer* 75:596-9.
- Wang, Y., T. Groot-Wassink, N.R. Lemoine, and G. Vassaux. 2003. Cellular characterization of the tropism of recombinant adenovirus for the adrenal glands. *Eur J Clin Invest* 33:794-8.
- Wei, M.Q., A. Mengesha, D. Good, and J. Anne. 2008. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett* 259:16-27.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30.
- Whittaker, S., R. Marais, and A.X. Zhu. 2010. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*.
- Wickham, T.J., P. Mathias, D.A. Cheresh, and G.R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-19.
- Wilcox, R.A., D.B. Flies, G. Zhu, A.J. Johnson, K. Tamada, A.I. Chapoval, S.E. Strome, L.R. Pease, and L. Chen. 2002. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* 109:651-9.
- Wogan, G.N. 2000. Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Semin Cancer Biol* 10:201-10.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and D. Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281-4.
- Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-8.
- Wong, C.M., S.T. Fan, and I.O. Ng. 2001. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 92:136-45.
- Wu, K., I. Kryczek, L. Chen, W. Zou, and T.H. Welling. 2009. Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res* 69:8067-75.
- Wyatt, L.S., S.T. Shors, B.R. Murphy, and B. Moss. 1996. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 14:1451-8.
- Xiang, Y.Y., V. Ladeda, and J. Filmus. 2001. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* 20:7408-12.
- Xu, J., Z.Y. Shen, X.G. Chen, Q. Zhang, H.J. Bian, P. Zhu, H.Y. Xu, F. Song, X.M. Yang, L. Mi, Q.C. Zhao, R. Tian, Q. Feng, S.H. Zhang, Y. Li, J.L. Jiang, L. Li, X.L. Yu, Z. Zhang, and Z.N. Chen. 2007. A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 45:269-76.

- Yamamoto, J., S. Okada, K. Shimada, T. Okusaka, S. Yamasaki, H. Ueno, and T. Kosuge. 2001. Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection. *Hepatology* 34:707-13.
- Yamauchi, N., A. Watanabe, M. Hishinuma, K. Ohashi, Y. Midorikawa, Y. Morishita, T. Niki, J. Shibahara, M. Mori, M. Makuuchi, Y. Hippo, T. Kodama, H. Iwanari, H. Aburatani, and M. Fukayama. 2005. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 18:1591-8.
- Yang, S., C.J. Cohen, P.D. Peng, Y. Zhao, L. Cassard, Z. Yu, Z. Zheng, S. Jones, N.P. Restifo, S.A. Rosenberg, and R.A. Morgan. 2008. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther* 15:1411-23.
- Yee, C., J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis, and P.D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-73.
- Yewdell, J.W., and J.R. Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17:51-88.
- Zerbini, A., M. Pilli, C. Ferrari, and G. Missale. 2006a. Is there a role for immunotherapy in hepatocellular carcinoma? *Dig Liver Dis* 38:221-5.
- Zerbini, A., M. Pilli, A. Penna, G. Pelosi, C. Schianchi, A. Molinari, S. Schivazappa, C. Zibera, F.F. Fagnoni, C. Ferrari, and G. Missale. 2006b. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 66:1139-46.
- Zerbini, A., M. Pilli, F. Fagnoni, G. Pelosi, M.G. Pizzi, S. Schivazappa, D. Laccabue, C. Cavallo, C. Schianchi, C. Ferrari, and G. Missale. 2008. Increased immunostimulatory activity conferred to antigen-presenting cells by exposure to antigen extract from hepatocellular carcinoma after radiofrequency thermal ablation. *J Immunother* 31:271-82.
- Zerbini, A., M. Pilli, P. Soliani, S. Ziegler, G. Pelosi, A. Orlandini, C. Cavallo, J. Uggeri, R. Scandroglio, P. Crafa, G.C. Spagnoli, C. Ferrari, and G. Missale. 2004. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 40:102-9.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-13.
- Zhang, W., J. Liu, Y. Wu, F. Xiao, Y. Wang, R. Wang, H. Yang, G. Wang, J. Yang, H. Deng, J. Li, Y. Wen, and Y. Wei. 2008. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma with a vaccine based on xenogeneic homologous alpha fetoprotein in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 376:10-4.
- Zhang, X., F. Cassis-Ghavami, M. Eller, J. Currier, B.M. Slike, X. Chen, J. Tartaglia, M. Marovich, and P. Spearman. 2007. Direct comparison of antigen production and induction of apoptosis by canarypox virus- and modified vaccinia virus ankara-human immunodeficiency virus vaccine vectors. *J Virol* 81:7022-33.
- Zhang, Y.J., Y. Chen, H. Ahsan, R.M. Lunn, S.Y. Chen, P.H. Lee, C.J. Chen, and R.M. Santella. 2005. Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 221:135-43.
- Zhou, J., Z. Wang, S.J. Qiu, X.W. Huang, J. Sun, W. Gu, and J. Fan. 2010. Surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: comparison of resection and liver transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol* 136:1453-60.
- Zhu, A.X. 2006. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *Oncologist* 11:790-800.
- Zhu, A.X., K. Stuart, L.S. Blaszkowsky, A. Muzikansky, D.P. Reitberg, J.W. Clark, P.C. Enzinger, P. Bhargava, J.A. Meyerhardt, K. Horgan, C.S. Fuchs, and D.P. Ryan. 2007a. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 110:581-9.
- Zhu, J., J. Martinez, X. Huang, and Y. Yang. 2007b. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* 109:619-25.
- Zucman-Rossi, J. 2010. Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 42 Suppl 3:S235-41.

### **Immunothérapie du carcinome hépatocellulaire (CHC) avec des virus de la vaccine recombinants exprimant l'alpha-foetoprotéine (AFP)**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente 5% de tous les cancers dans le monde et son incidence est en constante augmentation. Il n'existe pas à ce jour de traitement satisfaisant du CHC mais l'immunothérapie est une stratégie prometteuse.

Les travaux de recherche présentés ici ont pour but d'évaluer les potentialités d'une stratégie d'immunothérapie spécifique basée sur l'alpha-foetoprotéine (AFP), antigène tumoral spécifique du CHC.

Des vecteurs viraux MVA (Modified Virus Ankara) recombinants exprimant différentes formes de l'AFP ont été produits. La réponse immunitaire induite par ces vecteurs a été évaluée par Elispot dans des protocoles de vaccination de souris naïves. Une librairie de peptides de l'AFP a par ailleurs été utilisée pour rechercher des peptides immunodominants de l'AFP murine. Enfin, l'effet thérapeutique de ces vecteurs a été étudié dans deux modèles pertinents de CHC murin.

Nos travaux montrent que la vaccination MVA spécifique de l'AFP induit une réponse humorale persistante. Cependant, il n'a pas été possible de mettre en évidence de façon reproductible une activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ainsi, la vaccination AFP à l'aide de vecteurs MVA recombinants ne semble pas la plus appropriée pour l'immunothérapie du CHC dans le modèle murin étudié.

Mots clés : Virus de la vaccine modifié (MVA), alpha-foetoprotéine (AFP), immunothérapie, carcinome hépatocellulaire (CHC), librairie de peptides.

### **Immunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC) with recombinant vaccinia virus expressing alpha-fetoprotein (AFP)**

Five percent of all cancer in the world are due to hepatocellular carcinoma (HCC) and the incidence of this cancer is increasing. Up today, there is no efficient treatment available for HCC but immunotherapy is a promising strategy.

The aim of this work is to evaluate the efficiency of a specific immunotherapy approach based on alpha-fetoprotein (AFP) which is a tumoral antigen specific of HCC.

Recombinant MVA viral vectors (Modified Virus Ankara) expressing different forms of AFP have been produced. The immune response induced by these vectors has been evaluated by Elispot assay in naïve mice. A peptide library of murine AFP has been used to detect immunodominant peptides. Finally, the therapeutic effect of these vectors has been evaluated in two relevant HCC murin models.

Our results demonstrate that AFP specific vaccination based on MVA induced humoral and persistent response. However, we have not been able to detect a reproducible activation of CD8<sup>+</sup> lymphocytes. To conclude, it seems that AFP vaccination with MVA is not the most suitable way of vaccination for an immunotherapy approach of HCC in the murine models studied.

Key Words: Modified vaccine virus (MVA), alpha-fetoprotein (AFP), immunotherapy, hepatocellular carcinoma (HCC), peptide library.