

Année 2022

N° : MM262022

**MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
MASTER DE « **Biotechnologie médicale** »  
OPTION « **Biomédicale** »

Intitulé

**IMMUNOTHERAPIE SYSTEMIQUE CONTRE LE CANCER  
PAR DELIVRANCE DU GENE D'INTERLEUKINE 12 A  
L'AIDE DE PARTICULES TRANSMORPHIQUES**

Soutenu le 21/07/2022, par :

**ESSAADI Hafs**

Sous la direction de professeurs :

**BENTAYEBI Kaoutar, Encadrante**

**HAJITOU Amine, Co-encadrant**

Devant le jury composé de :

**Pr. OUADGHIRI Mouna**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Présidente**

**Pr. BENTAYEBI Kaoutar**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Encadrante**

**Pr. LOUATI Sara**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Examinatrice**



Je tiens tout d'abord à remercier et en premier **DIEU**, le Tout Puissant et Miséricordieux qui m'a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

Mes vifs remerciements à mes chers parents **Abdellah ESSAADI** et **Naima WAFI** pour leur encouragement, leur confiance et leurs sacrifices consentis pour mon éducation, un grand **MERCI** à vous.

Avec un immense plaisir, j'adresse tous mes sincères remerciements à mon encadrante de ce mémoire de master Madame **Kaoutar BENTAYEBI**, professeur à la faculté de médecine et pharmacie à Rabat, de m'avoir guidé et orienté vers ce travail, pour son encadrement et sa disponibilité inconditionnée.

Spécialement je remercie Professeur **Amine HAJITOU**, qui m'a offert l'opportunité de me co-encadrer. Mon encadrante et Pr. Hajitou m'ont transmis les piliers de la biologie moléculaire et de la thérapie ciblée. Les résultats ont été produits au sein du laboratoire du Pr. Hajitou au sein du prestigieux Imperial College London. J'ai eu l'opportunité d'apprendre de nouvelles technologies, formuler des hypothèses, développer des compétences de la rédaction scientifique, le design du protocole, l'analyse des données (statistiques et pratiques), la discussion des résultats et leurs comparaisons aux données présents dans la littérature et aussi le sens de l'innovation dans la recherche en formulant des questions scientifiques pour répondre aux problèmes actuels de manière innovante et critique. Je suis très reconnaissant pour sa contribution à mon projet de fin d'études, ses qualités humaines, professionnelles et scientifiques sont pour moi un modèle à suivre. Veuillez trouver ici le témoignage de mes plus chaleureux remerciements et de mon plus profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à notre coordinatrice Madame **Mouna OUADGHIRI**, professeur à la faculté de médecine et pharmacie à Rabat, pour ses efforts pendant les deux années précédentes malgré les circonstances difficiles du Covid, et de l'honneur d'avoir accepté d'être parmi les membres de jury.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame **Sara LOUATI**, professeur à la faculté de médecine et pharmacie à Rabat de l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être examinatrice de ce travail.

Je ne manquerai pas de remercier Professeur **Azeddine IBRAHIMI** Directeur du laboratoire de Biotechnologie médicale à la faculté de médecine et pharmacie Rabat. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Et certainement, je n'oublie pas mes collègues, amis et toute personne ayant contribué à la finalisation de ce projet.



Je dédie ce modeste projet

**A**

Mes parents qui m'ont soutenu durant toutes ces années d'études,  
ma source d'espoir et du courage, qu'ils trouvent dans cet ouvrage le  
fruit de leurs sacrifices et le témoignage de mon grand amour et ma  
gratitude la plus sincère.

**A**

Mes professeurs qui m'ont appris plusieurs notions qui me serviront beaucoup  
dans ma vie professionnelle.

**A**

Mes chers frères, amis et collègues qui m'ont encouragé et m'ont aidé  
dans mon cursus professionnel de près ou loin.

## Liste des abréviations

<b>AAV</b>	Virus adéno-associé
<b>AAVP</b>	Phage/virus adéno-associé
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFP</b>	Alphafœtoprotéine
<b>APS</b>	Antigène prostatique spécifique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATTC</b>	American Type Culture Collection
<b>BLI</b>	Imagerie en bioluminescence
<b>CAR</b>	Chimeric antigen receptor
<b>CAR NK</b>	Chimeric antigen receptor natural killer
<b>CCL3</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 3
<b>CCL4</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 4
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CEA</b>	Antigène carcino-embryonnaire
<b>cGAS-STING</b>	cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes
<b>CMH</b>	Complexe d'histocompatibilité
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CPA</b>	Cellules présentatrice d'antigènes
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
<b>CXCL</b>	CXC chemokine ligand
<b>DAMP</b>	Modèle moléculaire associé au dommages
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DO</b>	Densité optique
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>ERK</b>	Extracellular Signal-Regulated Kinase
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>FOXP3</b>	forkhead box P3
<b>GADD</b>	Growth Arrest and DNA Damage.
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony stimulating factor.
<b>GST</b>	Gene suppresseur de tumeur
<b>Her2</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HSV</b>	Virus de l'herpes simplex
<b>HSVtk</b>	Gene syucudaire de l'herpès simplex
<b>ICAM-1</b>	Inter Cellular Adhesion Molecule 1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukine
<b>ILC</b>	Innate Lymphoid Cells
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IRF-3</b>	Facteur de régulation des interférons
<b>ITR</b>	Répétition terminale inversée
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase

<b>Luc</b>	Luciférase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MMP-9</b>	Métalloprotéase matricielle 9
<b>NEB</b>	New England Biolabs
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Facteur nucléaire kappa B
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NT</b>	Non ciblé
<b>PAMP</b>	Modèle moléculaire associé aux agents pathogènes
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PD-1</b>	Programmed cell death
<b>PD-L1</b>	Programmed cell death 1 ligand 1
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PRR</b>	Reconnaissance de motif moléculaire
<b>PVDF</b>	Hydrophilic polyvinylidene fluoride
<b>rAAV</b>	The recombinant adeno-associated virus vector
<b>RGD4C</b>	ACDCRGDCFCG
<b>RIG-I</b>	Retinoic acid-inducible gene I
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>TAA</b>	Antigènes associées aux tumeurs
<b>T-bet</b>	Boite T
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>Th</b>	Lymphocyte T helper
<b>TLR</b>	Toll-like receptors
<b>TPA</b>	Particule de phage/AAV transmorphique
<b>TYE</b>	Extrait de levure Tryptone
<b>TYK2</b>	Tyrosine kinase 2
<b>VCAM-1</b>	vascular cell adhesion molecule 1
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor

## Liste des figures

Figure 1. La conversion d'un proto-oncogène en un oncogène actif.....	2
Figure 2. Déséquilibre oncogène/Anti-oncogène.....	3
Figure 3. Étapes de la cancérogénèse.....	5
Figure 4. Les différences entre les tumeurs solides et les tumeurs liquides. ....	6
Figure 5. Mécanisme d'action antitumoral de certains médicaments conduisant à l'arrêt cellulaire et à la mort cellulaire. ....	9
Figure 6. Cycle d'immunité contre le cancer. ....	11
Figure 7. Les cellules immunitaires innées engagées pour renforcer l'immunité antitumorale pour l'immunothérapie. ....	12
Figure 8. La réponse immunitaire dans le cas des tumeurs solides. A. la réponse antitumorale normale ; B. La résistance et l'échappement à la réponse immunitaire antitumorale.....	14
Figure 9. Les antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA) et les antigènes associés aux tumeurs (TAA).....	15
Figure 10. Le phénomène d'immunosurveillance adapté. ....	16
Figure 11. Mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire .....	17
Figure 12. L'interleukine-12 a plusieurs mécanismes d'action distincts qui conduisent à la mort des cellules tumorales. ....	18
Figure 13. Réponses cellulaires à la stimulation de l'IL-12 dans le tissu tumoral.....	19
Figure 14. Action des anticorps monoclonaux immunomodulateurs. ....	25
Figure 15. Principe des vaccins thérapeutiques.....	26
Figure 16. Structure générale des récepteurs antigéniques chimériques (CAR).....	28
Figure 17. Mode d'emploi des cellules CAR-T. ....	29
Figure 18. Structure du vecteur hybride AAV/phage (AAVP) développé par Hajitou et al.2006.....	39
Figure 19. Construction du TPA .....	50
Figure 20 Imagerie en bioluminescence in vivo (BLI) de Luciferase. ....	51
Figure 21. Graphique montrant la croissance tumorale après administration ciblée d'IL12. Des souris porteuses de tumeurs injectées avec des particules de TPA non ciblées (NT) ont été incluses comme témoins (n = 4 souris par groupe) .....	52
Figure 22. Analyse du changement de la croissance tumorale (n =4 souris) après immunothérapie à l'IL12. ....	53
Figure 23. Courbes de Kaplan-Meier montrant le bénéfice de survie pour les souris porteuses de tumeurs (n = 4) de deux groupes expérimentaux. ....	53
Figure 24. Quantification en série de l'IL12 dans des milieux de cellules B16.F10 traitées avec RGD4C.TPA. IL12 ou contrôles. ....	54
Figure 25. RGD4C.TPA. Immunothérapie à l'IL12 des tumeurs B16.F10 sous-cutanées chez la souris C57BL/6 (n = 4). ....	55

# Résumé

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. On estime un taux de l'ordre de 10 millions de décès en 2020 (selon l'OMS). La plupart des cas atteints de cancer sont traités par une combinaison de chimiothérapie, de radiothérapie qui attaquent aussi les cellules saines.

Cependant, la prise en charge thérapeutique sécurisée des patients a été dernièrement révolutionnée par l'introduction de l'immunothérapie guidée, qui ne cible que les cellules cancéreuses pour déclencher une réponse immunitaire antitumorale. L'immunothérapie des cancers regroupe plusieurs stratégies : le transfert de cellules immunitaires, les vaccins thérapeutiques, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, les anticorps monoclonaux et les cytokines. L'utilisation de ces derniers a plusieurs contraintes, à cause de leur nature pléiotropique, qui cause des effets indésirables importants dont l'activation de l'orage cytokinique, qui peut être fatal. Ce grand défi est une importante barrière contre la validation et le succès clinique de l'immunothérapie par cytokines chez les patients cancéreux. L'IL-12 a la particularité d'activer à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative antitumorale, d'où sa popularité suite à son importante efficacité pré-clinique et des résultats cliniques préliminaires encourageants.

Le but de notre étude est de tester une immunothérapie basée sur une nouvelle génération de vecteur viral hybride « procaryote-eucaryote » nommé TPA (des particules de phage/AAV transmorphiques). Il s'agit d'un nano-produit qui provient de phage auxiliaire filamentueux M13KO7 et un plasmide TPA constitué à partir de l'ADN du sérotype 2 du rAAV (virus adéno-assicié). TPA est destinée à délivrer un transgène qui code pour l'IL-12 dans différents modèles de tumeurs in vitro et in vivo, afin d'éliminer les cellules tumorales de façon ciblée, spécifique, efficace et sécurisée. L'application de cette nanotechnologie permettra de relever les défis de l'administration efficace et sécurisée de l'immunothérapie par l'IL-12 chez l'homme.

**Mots clés :** Immunothérapie du cancer, Particule AAVP transmorphiques TPA, Interleukine 12, Délivrance ciblée de gènes.

# Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. According to the WHO, an estimated rate of 10 million deaths in 2020. Most cases with cancer are treated with a combination of chemotherapy and radiation therapy that also attacks healthy cells.

However, the safe therapeutic management of patients has recently been revolutionized by the introduction of guided immunotherapy, which only aims cancer cells to activate an antitumor immune response. Cancer immunotherapy includes several strategies: immune cell transfer, therapeutic vaccines, immune checkpoint inhibitors, monoclonal antibodies and cytokines. The use of these strategies has several complications, because of their pleiotropic nature, which causes significant negative effects such as the activation of cytokine storm, which can be fatal.

This challenge is an important barrier against the validation and the clinical success of cytokine immunotherapy. IL-12 has the particularity of activating both the innate and adaptive antitumor immune response, hence its popularity due to its significant pre-clinical efficacy and encouraging preliminary clinical results.

The aim of our study is to test immunotherapy based on a new generation of hybrid viral vector "prokaryotic-eukaryotic" called TPA (transmorphic phage/AAV particles). It's a nano-product that comes from filamentous auxiliary phage M13KO7 and a TPA plasmid made from the DNA of serotype 2 of rAAV (adeno-associated virus). TPA is intended to deliver a transgene that encodes for IL-12 in different tumor models in vitro and in vivo, in order to eliminate tumor cells in a targeted, specific, efficient and safe way.

The application of this nanotechnology will help to overcome the challenges of the efficient and safe administration of IL-12 immunotherapy in human treatment.

**Keywords:** Cancer immunotherapy, TPA transmorphic AAVP particle, Interleukin 12, Targeted gene delivery.

## ملخص

السرطان هو أحد الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم. يقدر معدل الوفيات بنحو 10 ملايين عام 2020 (حسب منظمة الصحة العالمية). يتم علاج معظم حالات السرطان بمزيج من العلاج الكيميائي والعلاج الإشعاعي الذي يهاجم أيضاً الخلايا السليمة. ومع ذلك، فقد أحدثت الإدارة العلاجية الآمنة للمرضى ثورة مؤخراً من خلال إدخال العلاج المناعي الموجه، والذي يستهدف الخلايا السرطانية فقط لتحفيز الاستجابة المناعية المضادة للسرطان. يجمع العلاج المناعي للسرطان بين عدة استراتيجيات: نقل الخلايا المناعية واللقاحات العلاجية ومثبطات نقاط التفتيش المناعية والأجسام المضادة وحيدة النسيلة والسيتوكينات. استخدام هذا الأخير له عدة قيود، بسبب طبيعتها متعددة الاتجاهات، والتي تسبب آثاراً ضارة كبيرة بما في ذلك تنشيط عاصفة السيتوكين، والتي يمكن أن تكون قاتلة. يمثل هذا التحدي الكبير حاجزاً مهماً ضد التحقق من صحة العلاج المناعي السيتوكيني ونجاحه السريري عند مرضى السرطان. يتمتع الأنترلوكين 12 بخصوصية تنشيط كل من الاستجابة المناعية الفطرية والمكتسبة المضادة للورم، ومن ثم شعبيته بعد فعاليته الكبيرة قبل السريرية وتشجيع النتائج السريرية الأولية. الهدف من دراستنا هو اختبار العلاج المناعي على أساس جيل جديد من الناقل الفيروسي الهجين "بدانيات النوى - حقيقيات النوى" المسمى (جسيمات فيروس بكتيري متحول). هذه الجسيمات تهدف إلى توصيل الجين المحور الذي يرمز للإنترلوكين 12 في نماذج أورام مختلفة في المختبر وفي الأجسام الحية، من أجل القضاء على الخلايا السرطانية بطريقة مستهدفة ومحددة وفعالة وآمنة. سوف يعالج تطبيق تقنية النانو هذه تحديات الإدارة الفعالة والآمنة للعلاج المناعي للإنترلوكين 12- عند البشر.

الكلمات المفتاحية: العلاج المناعي للسرطان، إنترلوكين 12، توصيل الجينات المستهدفة.

# Table des matières

Liste des abréviations .....	
Liste des figures .....	
Résumé.....	
Abstract .....	
ملخص .....	
Introduction générale .....	1
Partie théorique .....	Erreur ! Signet non défini.
I.    Cancérologie.....	2
1.    L'oncogenèse .....	2
2- Classification des cancers .....	5
3- Traitements.....	7
4- Les problèmes et défis thérapeutiques .....	9
II.   Immunité antitumorale .....	10
1- Réponse immunitaire antitumorale et ses effecteurs.....	10
2- Antigènes tumoraux.....	14
3- Immunosurveillance antitumorale .....	16
4- La biologie de l'interleukine 12 .....	18
III.  Immunothérapie.....	22
1- Les différentes classes de l'immunothérapie .....	22
2- Immunothérapie par des cytokines .....	30
3- Thérapie génique des cancers et spécificité .....	32
IV.  Hypothèse .....	40
V.  Objectifs.....	41
Partie pratique .....	42
I.    Matériel et méthodes .....	42
II.   Résultats .....	49
III.  Discussion .....	55
Conclusion .....	58
Liste des références.....	59

# Introduction générale

L'immunothérapie par cytokines a le potentiel de créer un impact énorme dans le traitement du cancer si elle est capable de surmonter les limitations existantes associées aux méthodes d'administration, à la spécificité et la sécurité. Parce que les cytokines sont des molécules pléiotropes qui peuvent engendrer des effets secondaires, la réalisation d'un contrôle spécifique de leur synthèse et de leur libération a été un défi insurmontable.

Le recrutement de système immunitaire pour cibler et détruire les cellules tumorales est une approche thérapeutique efficace en raison de l'éventail complexe de mécanismes cellulaires qui induisent une cytotoxicité directement sur la pathologie. Pour cela on va étudier l'immunothérapie par l'IL-12 qui agit comme un pont entre l'immunité innée et adaptative, activant le Th 1, entraînant une cytotoxicité à médiation cellulaire par l'induction et d'INF $\gamma$ .

La délivrance de gènes de cytokines à la pathologie est une approche lucrative qui peut cibler efficacement les cellules malignes tout en épargnant les tissus normaux de l'effet non sélectif des cytokines. À l'heure actuelle, plusieurs groupes ont essayé de développer des vecteurs à base de phages pour la thérapie génique humaine avec un succès limité en raison de la faible expression des gènes dérivés des cassettes transgéniques conventionnelles. Hajitou et al, ont développé un vecteur hybride, le virus adéno-associé/phage (AAVP), qui ciblait les vaisseaux sanguins angiogéniques des tumeurs solides et des cellules tumorales en dotant le gène de la protéine d'enveloppe mineure du phage (pIII) d'une double mutation cyclique RGD4C, tout en permettant des applications en thérapie ciblée, mais son efficacité de transfert de gènes in vitro reste incomparable aux virus de mammifères n'a pas donné un succès suffisant dans la délivrance de gènes eucaryotes.

Dans cette étude, nous avons développé une nouvelle approche pour la livraison de gènes de cytokines systémiquement ciblées à l'aide de particules transmorphiques (TPA) basées sur une capsid de phage filamenteux M13 et l'ADN de rAAV-2 portant des cassettes d'expression transgénique de l'IL-12 flanquées de répétitions terminales inversées (ITR) de rAAV-2. La raison de la combinaison du phénotype et du génotype entre deux virus de classifications différentes est de combiner la spécificité et les propriétés moins immunogènes de la capsid de phage avec l'efficacité de l'expression génique observée dans les vecteurs rAAV.

Nous avons tenté de relever les défis en utilisant TPA pour délivrer un transgène de l'IL-12 à des cellules tumorales in vitro, et in vivo à des tumeurs dans des modèles précliniques de souris afin d'évaluer son efficacité et spécificité de délivrance.

Alors comment se produit notre vecteur TPA ? Est-ce que la délivrance du transgène de l'IL-12 aux tumeurs est spécifique, efficace, et sécurisée ?

# Revue bibliographique

## I. Cancérologie

### 1. L'oncogénèse

#### 1.1- Bases moléculaires de la pathologie tumorale

##### 1.1.1- Les oncogènes

Un oncogène est l'un de très nombreux gènes qui contribuera à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Il dérive de proto-oncogènes cellulaires, qui sont des gènes normaux qui codent pour des protéines qui stimulent la division cellulaire, inhibent la différenciation cellulaire et haltent la mort cellulaire ou l'apoptose. Ces processus sont essentiels pour un développement normal et pour le maintien des organes et tissus.

Les proto-oncogènes sont activés en oncogènes suite à une modification de type mutation généralement dominante, duplication du gène ou réarrangement chromosomique (figure 1), les divisions cellulaires sont alors incontrôlées, la différenciation cellulaire diminue et l'apoptose est inhibée. Tous ces facteurs entraînent la tumorigénèse (Hunter, T. 1991). Les oncogènes constituent une cible majeure dans le développement des thérapies anti-cancéreuses (tableau 1).

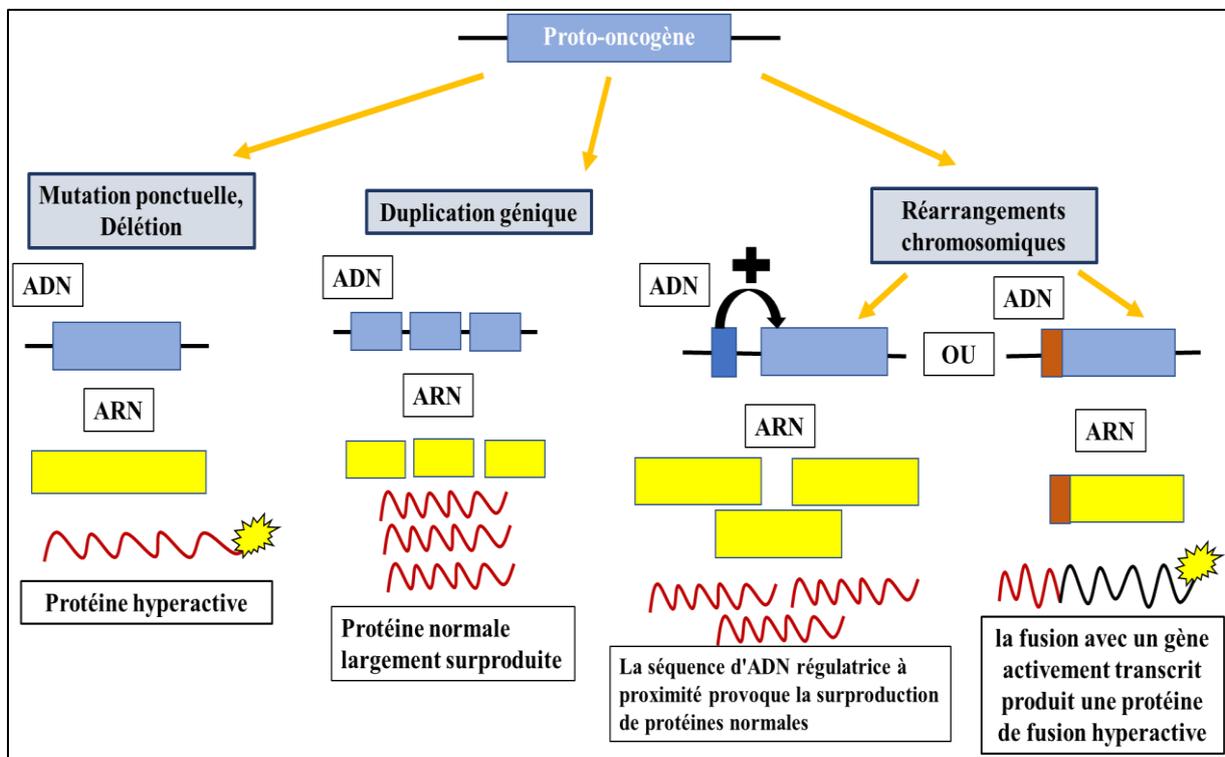


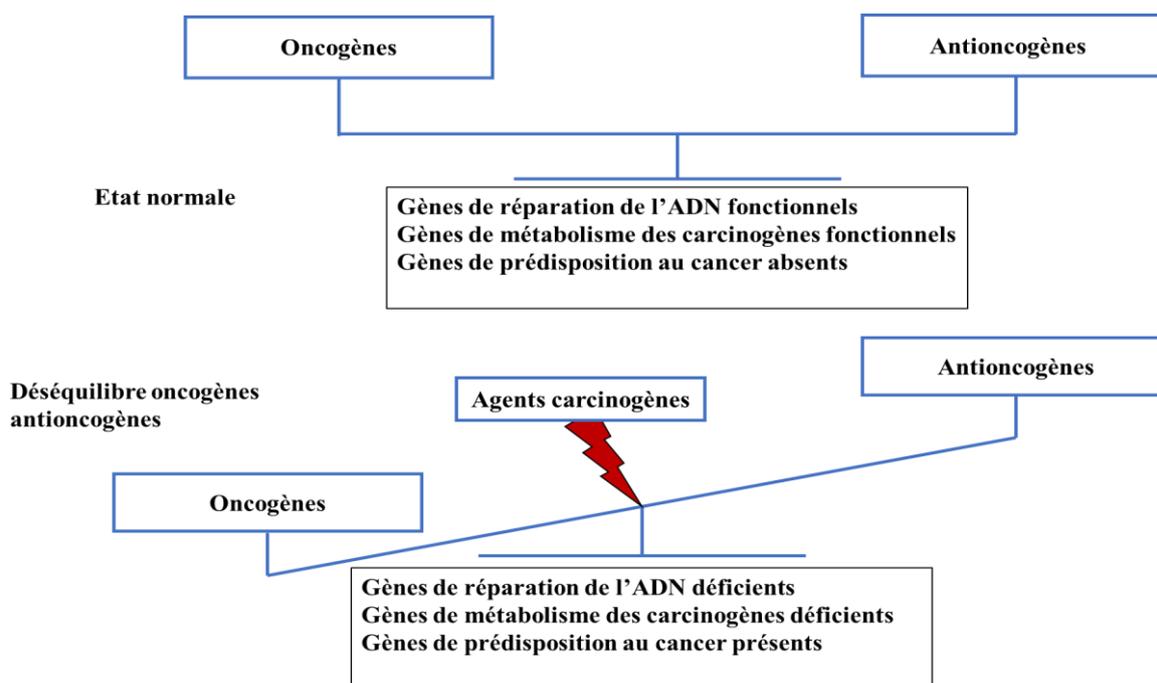
Figure 1. La conversion d'un proto-oncogène en un oncogène actif (Alberts, B. 2002).

**Tableau 1.** Exemples de proto-oncogènes impliqués dans des tumeurs humaines (Jake, S. et al 2012).

Nom	Fonction	Pathologies résultants de leur activation
erbB	Récepteur facteur de croissance épidermique.	Cancers du sein, prostate, foie, colon, pancréas, gliomes.
ras	Protéine G	Cancers de la vessie, du sein, du foie, du colon.
myc	Facteur de transcription.	Cancers très variés.
fos	Facteur de transcription.	Carcinomes, leucémies.
TSHr	Récepteur à TSH.	Hyperthyroïdisme malin.
Bcl2	Facteur anti-apoptotique.	Résistance aux cytotoxiques.

### 1.1.2- Gènes suppresseurs de tumeur

Les gènes suppresseurs de tumeur (GST) ou anti-oncogènes, sont des gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est d'inhiber la division et la prolifération cellulaire, stimuler la mort cellulaire et réparer l'ADN endommagé. A l'image des autres gènes, des mutations des GSTs (souvent récessive) peut résulter en une perte de fonction de ces protéines et par conséquent la tumorigenèse (figure 2) (Yamasaki, H. et al 1999).



**Figure 2.** Déséquilibre oncogènes/Anti-oncogènes (Pardal, R. 2005).

## **1.2- Mécanisme de l'oncogenèse**

L'oncogenèse, encore appelée cancérogenèse, correspond à l'ensemble des mécanismes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse. C'est un processus lent qui évolue en 5 étapes : l'initiation, la promotion, la progression, la conversion maligne et la dissémination (**Weston, A. et al. 2003**).

- **Initiation de la tumeur**

L'initiation est la première étape de la cancérisation d'une cellule. Elle correspond à une lésion irréversible de l'ADN, le plus souvent une mutation, induite par l'exposition à un agent génotoxique initiateur de tumeur. Cela entraîne une modification du génome, un déséquilibre entre oncogènes et anti-oncogènes qui perturbe le cycle cellulaire (figure2), permettant à la cellule d'échapper aux mécanismes de contrôle et de donner naissance à une cellule initiée (figure 3) (**Béliveau et al. 2007**).

Par exemple les cancérogènes chimiques provoquent des erreurs génétiques en modifiant la structure moléculaire de l'ADN, ces modifications peuvent conduire à des mutations lors de la synthèse de l'ADN. Le plus souvent, cela est provoqué par la formation d'un adduit entre le cancérigène chimique ou l'un de ses groupes fonctionnels et un nucléotide dans l'ADN ce qui provoque soit l'activation d'un proto-oncogène, soit l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (**Pardal, R. 2005**).

- **Promotion de la tumeur**

Cette seconde étape, aussi appelée immortalisation, correspond à l'expansion clonale sélective de cellules initiées. Ceci grâce à des promoteurs de tumeurs qui sont généralement non mutagènes et ne sont pas cancérigènes, mais ils sont caractérisés par leur capacité à réduire la période de latence pour la formation de tumeurs après exposition d'un tissu à un initiateur de cancérogenèse (figure 3) (**Pardal, R. 2005**).

- **La conversion maligne**

La conversion maligne est la transformation d'une cellule préneoplasique en une cellule exprimant le phénotype malin. Ce processus nécessite d'autres modifications génétiques. La conversion d'une fraction de ces cellules en malignité sera accélérée par l'exposition de cellules préneoplasiques à des agents endommageant l'ADN, et ce processus peut être médié par

l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (figure 3) (Pardal, R. 2005).

- **Progression de la tumeur**

La progression tumorale est un processus dynamique, passant par une reprogrammation du matériel génétique allant dans le sens d'une dédifférenciation cellulaire et d'une augmentation de l'agressivité des cellules cancéreuses. Les cellules qui s'échappent à l'apoptose, sont insensibles aux antiprolifératifs, et elles ont la capacité de proliférer de façon illimitée avec une angiogénèse. Cette phase est une phase d'invasion locale, à l'origine du phénomène de dissémination métastatique (figure 3) (Béliveau et al. 2007).

- **La dissémination de la tumeur**

Le dernier stade de l'oncogénèse est la dissémination tumorale, les cellules cancéreuses deviennent invasives et se détachent du foyer initial pour migrer et coloniser des tissus avoisinants ou d'autres endroits de l'organisme. Ces cancers "secondaires" sont appelés des métastases (figure 3) (Béliveau et al. 2007).

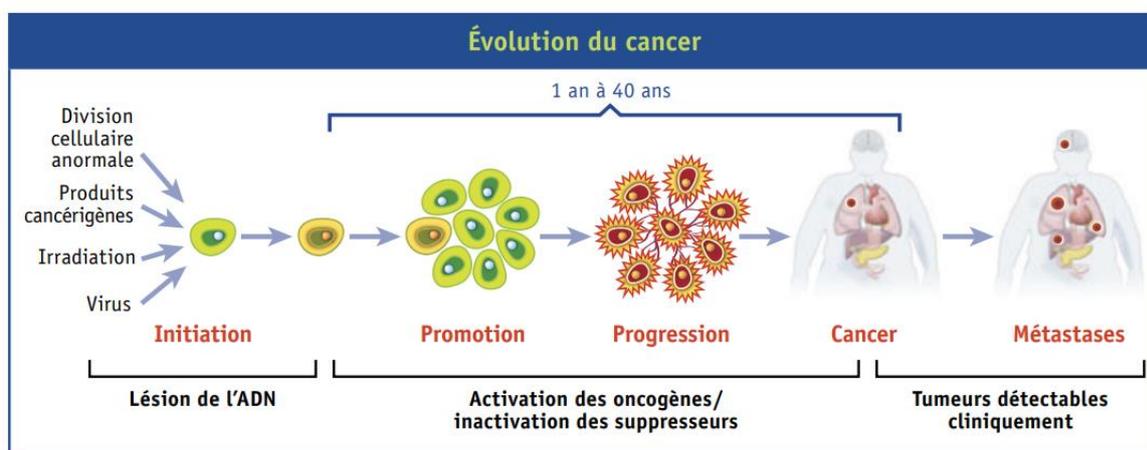


Figure 3. Étapes de la cancérogénèse (Béliveau et al. 2007).

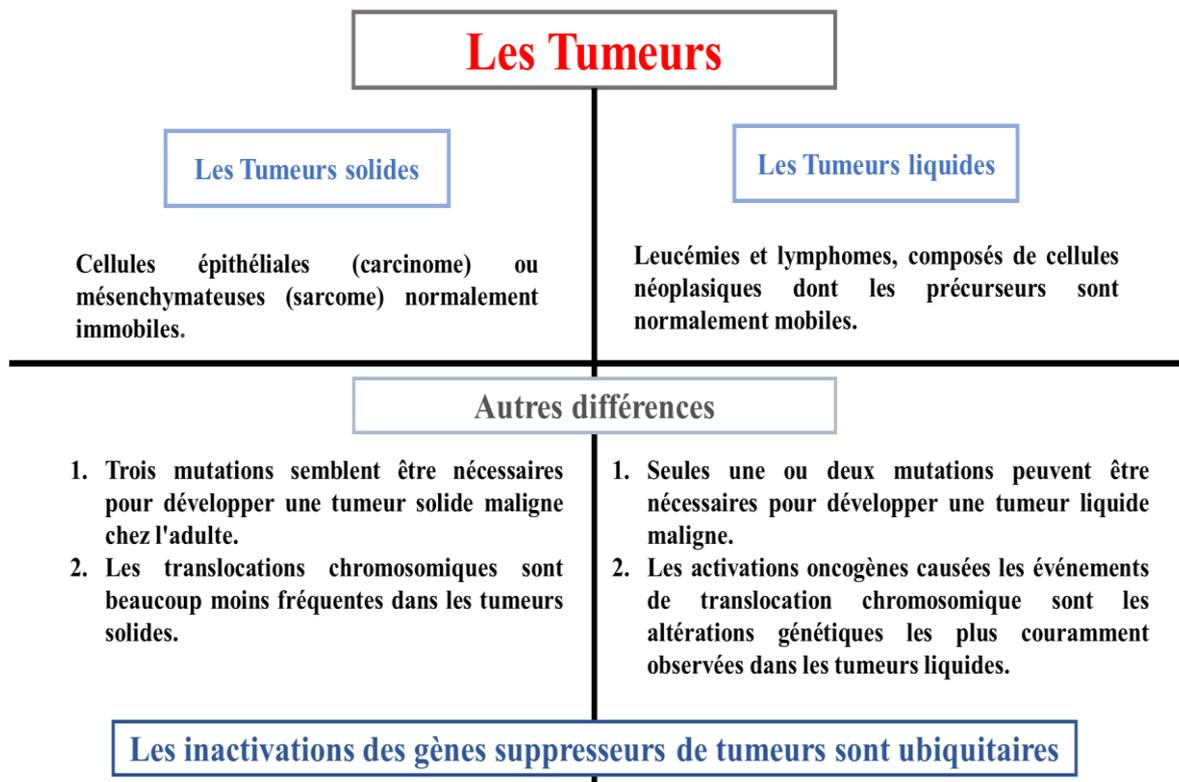
## 2- Classification des cancers

Les cancers les plus fréquents chez l'homme varient relativement d'une population à une autre. Par exemple, les cancers les plus fréquents chez l'homme au Maroc et au Royaume Unis sont successivement : le cancer du poumon, de la prostate et du colorectum. Tandis que chez la femme on s'aperçoit majoritairement du cancer du sein, suivi par le cancer du col utérin et le cancer colorectal au Maroc et du cancer du sein, cancer du col utérin et cancer du poumon au

Royaume Unis (Office for national statistics. England, 2017, et The Global Cancer Observatory. 2021).

## 2.1- Classification histologique

Il existe plusieurs types de cancers, qui sont classés en fonction de tissus atteints, on distingue deux grandes catégories, les tumeurs "liquides" et les tumeurs "solides" (figure4) (Mandal, A. 2019).



*Figure 4. Les différences entre les tumeurs solides et les tumeurs liquides (Mandal, A. 2019).*

- **Les tumeurs "liquides" ou hématologiques**

Les cellules du sang naissent dans la moelle osseuse puis circulent dans le sang et la lymphe. Les cancers hématologiques sont donc des tumeurs liquides. On distingue les leucémies, dans la moelle osseuse et le sang, le myélome dans la moelle osseuse et les lymphomes touchant les ganglions lymphatiques. Ces tumeurs représentent 7% de l'ensemble des cancers, ils sont plus rares que les tumeurs solides chez l'adulte mais sont en revanche assez fréquents chez l'enfant (Cooper, GM. 2000).

- **Les tumeurs "solides"**

Les tumeurs "solides" sont les plus communes, elles sont repérées grâce au développement d'une masse ou d'un tissu anormal, dépourvu généralement de kystes ou de liquides (**Cooper, GM. 2000**).

## **2.2- Classification TNM**

Le TNM est un système de classification des tumeurs cancéreuses solides de l'Union internationale contre le cancer (UICC). C'est le système de classification le plus fréquemment utilisé en oncologie. L'utilisation de ce type de classification permet aux médecins d'avoir un langage universel pour décrire le cancer (**Rosen, RD. 2022**).

- T (tumor) : Tumeur.
- N (nodes) : ganglions régionaux.
- M (metastasis) : métastases à distance.

## **3- Traitements**

Il existe diverses formes de cancer ce qui fait appel à divers types de traitements dont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, les traitements ciblés, l'hormonothérapie et l'immunothérapie, seuls ou combinés dans différents protocoles thérapeutiques selon la nature et le stade de la tumeur.

### **3.1- La chirurgie**

La chirurgie est un traitement local du cancer, utilisé en première intention, c'est le traitement des cancers le plus ancien. Le but de la chirurgie est l'exérèse de la tumeur à un stade où la tumeur n'a pas encore métastasée. Parfois elle impose souvent d'enlever non seulement la tumeur ou l'organe atteint, mais aussi une marge de tissus sains autour de la tumeur et les ganglions voisins. La chirurgie ne peut pas être pratiquée si (**Zongo, N. et al 2015**) :

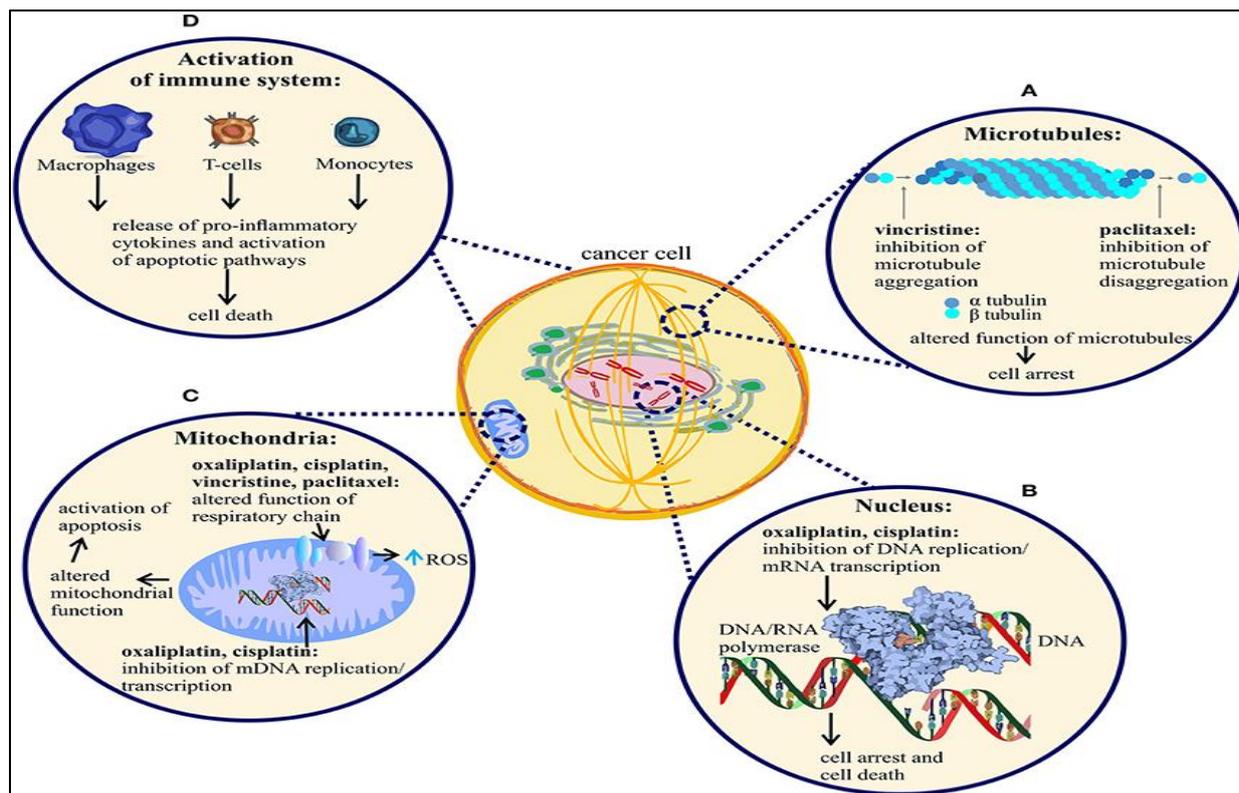
- Il y a présence de métastases en nombre illimité.
- L'état général de santé du patient ne permet pas l'intervention chirurgicale.
- La maladie n'est pas localement contrôlée, c'est-à-dire qu'il y a risque de récurrence et d'extension locale.

### **3.2- La radiothérapie**

Elle consiste à l'utilisation de rayonnements ionisants, électromagnétiques ou particulaire, de manière très localisée afin de protéger au maximum les tissus sains avoisinants. Les rayons électromagnétiques comprennent les rayons gamma résultants d'une désintégration de noyaux ou de particules radioactifs, et les rayons X émis par un choc entre un faisceau d'électrons et une surface métallique. Les rayonnements particulaires incluent les électrons, les protons, les neutrons et les particules alpha (noyaux d'hélium). Ces rayonnements, s'ils ne tuent pas directement les cellules, détruisent leur appareil de reproduction d'une manière que ces cellules tumorales ne peuvent plus se diviser. Cette thérapie peut également être prescrite afin de se débarrasser des cellules cancéreuses qui auraient échappé à la chirurgie. La sensibilité aux radiations varie selon les tissus et les différents types de cellules (**Maani, EV et al 2021**).

### **3.3- La chimiothérapie**

La chimiothérapie est le traitement du cancer par des substances chimiques qui sont véhiculées dans tout l'organisme à travers la circulation sanguine. Tous les médicaments utilisés en chimiothérapie visent à inhiber la prolifération cellulaire et la multiplication des tumeurs et donc préviennent l'invasion et la métastase. Cependant cet effet atteint aussi bien les cellules normales que cancéreuses. Les agents chimio-thérapeutiques peuvent agir à plusieurs niveaux de la cellule et de son environnement pour inhiber la prolifération cellulaire : ils interfèrent avec la synthèse et l'expression de l'ADN, l'ARN, les protéines ou agissent au niveau du fonctionnement de ces molécules, notamment les mécanismes de division cellulaire (figure 5) (**Amjad, MT et al. 2022**).



*Figure 5. Mécanisme d'action antitumoral de certains médicaments conduisant à l'arrêt et à la mort cellulaire (Starobova, H. 2017).*

### 3.4- L'hormonothérapie

Certains cancers tels que les cancers du sein et de la prostate, sont sensibles aux hormones sexuelles en allant bloquer le récepteur hormonal sur ces cellules cancéreuses pour empêcher leur prolifération. Dans le cas du cancer du sein, le Tamoxifène, un anti-oestrogène, a largement fait ses preuves pour éviter les récives, surtout chez la femme ménopausée (Drăgănescu, M et al. 2017). Dans le cancer de la prostate, il existe plusieurs médicaments dont l'action est d'inhiber la sécrétion de la testostérone, et donc d'empêcher la croissance du cancer (Akakura, K. 2016).

La chirurgie et l'irradiation sont plus efficaces lorsque les cancers sont limités à une région de l'organisme. Outre la chimiothérapie et l'hormonothérapie permettent de prévenir la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme.

### 4- Les problèmes et défis thérapeutiques

Les traitements du cancer cités au-dessus présentent plusieurs inconvénients et problèmes thérapeutiques. Par exemple en radiothérapie, on ne peut pas éviter totalement d'irradier les tissus sains autour de la tumeur et les organes avoisinants. C'est ce qui explique l'apparition des

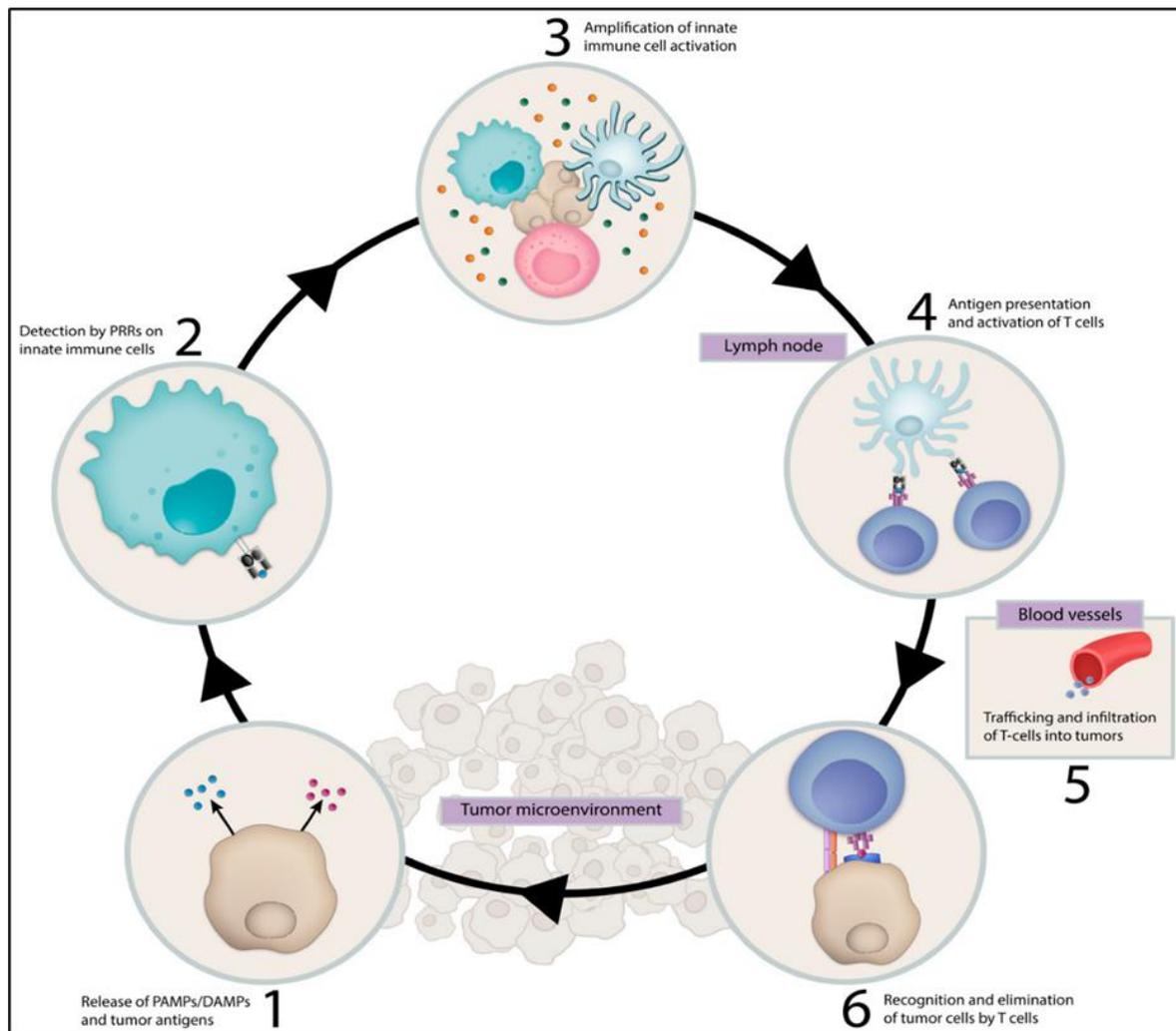
effets secondaires qui varient selon la zone traitée, la dose de rayons délivrée, la technique utilisée, l'effet des autres traitements et l'état général du patient (**Majeed, H et al. 2021**). En effet la chimiothérapie a deux principaux problèmes, la toxicité sur les tissus sains et l'apparition d'une résistance des cellules tumorales, ce qui entraîne des nausées, vomissements, fatigue et l'alopecie. Les patients doivent gérer les effets secondaires à long terme (**Amjad, MT et al. 2022**). Les défis thérapeutiques consistent à traiter le cancer en évitant ou en minimisant ces effets indésirables, et ceci en ciblant directement les tumeurs sans endommager les tissus et les organes sains. Développer des traitements efficaces, sécurisés et sélectifs s'avère important.

## **II. Immunité antitumorale**

Stimuler le système immunitaire afin de s'opposer à la croissance des cellules cancéreuses est une idée vieille. Au 19ème siècle, William Coley observa que l'injection d'extraits bactériens pouvait entraîner la régression de tumeurs chez des patients atteints de cancers. Des années plus tard, d'autres équipes supportent le concept selon lequel le système immunitaire est capable de détecter et d'éliminer des cellules tumorales, en confirmant que l'injection d'extraits de bactéries à des souris entraîne la nécrose hémorragique de leurs tumeurs. Il a été initialement démontré qu'une augmentation de l'incidence de certains cancers se voit pendant la période néonatale, chez les sujets âgés et aussi chez les sujets immunodéprimés (**Vesely, M et al 2014**).

### **1- Réponse immunitaire antitumorale et ses effecteurs**

Le système immunitaire ou système lymphoïde nous protège des éléments étrangers tels que les virus, bactéries ou d'autres agents pathogènes ainsi que les cellules endommagées, en les identifiant, en les maîtrisant et en les détruisant. Cette protection est assurée par des cellules, des tissus et des organes spécialisés. Il existe deux manières de répondre à une attaque d'un agent pathogène : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative (figure 6) (**Nicholson, LB. 2016**).



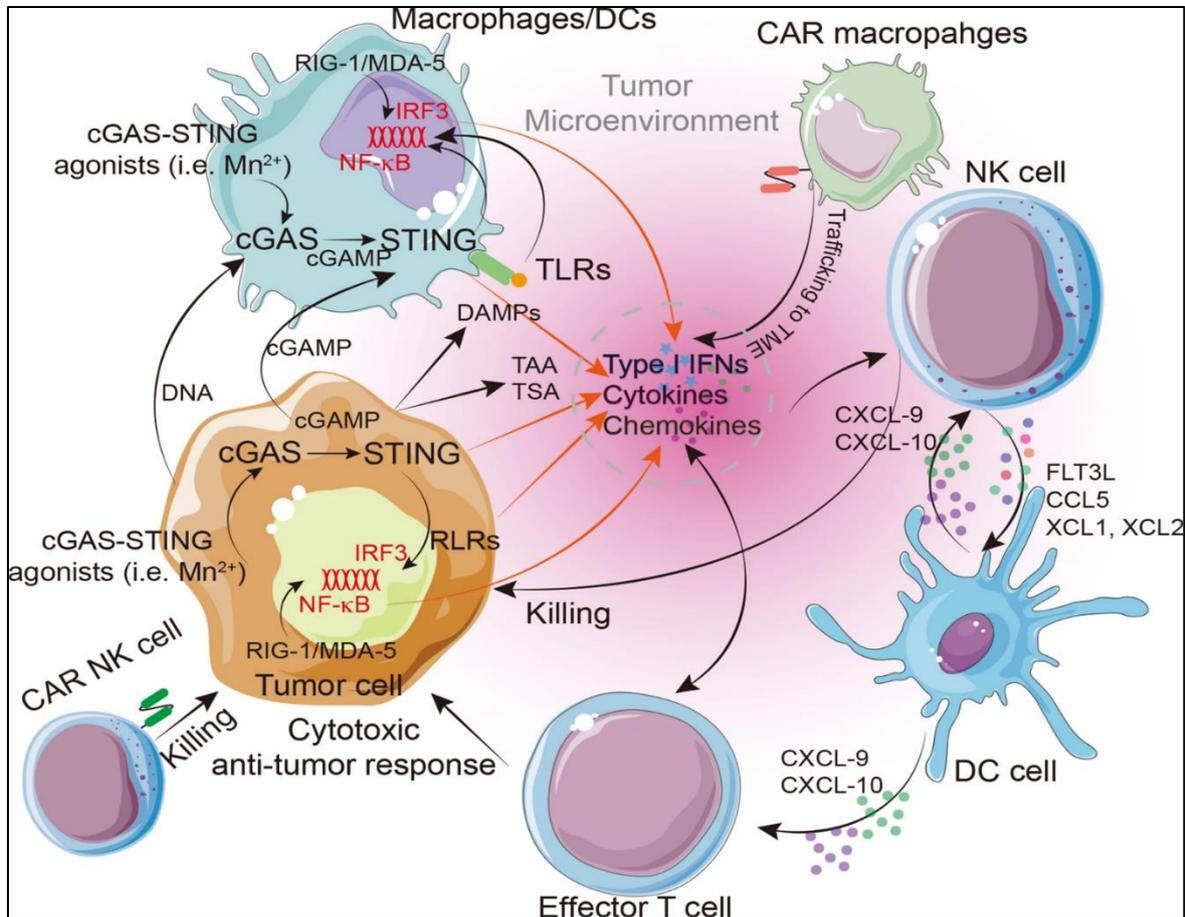
**Figure 6.** Cycle d'immunité contre le cancer (Rameshbabu, S et al. 2021).

Les cellules immunitaires innées facilitent la réponse du système immunitaire contre un agent pathogène reconnu. Ce processus est initié par la détection de modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) et de modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP) et d'autres antigènes tumoraux uniques par les cellules immunitaires innées, ce qui entraîne la présentation de l'antigène et l'activation des cellules T spécifiques de l'antigène dans la lymphe drainante de la tumeur. Ces lymphocytes T se dirigent vers la tumeur et interviennent dans l'élimination de la tumeur (Rameshbabu, S et al. 2021).

### 1.1- Immunité innée

L'immunité innée ou naturelle est la première ligne de défense de notre organisme, active dès la naissance, c'est une immunité non spécifique, indépendante de l'antigène, au cours de laquelle interviennent les barrières physiques telles que la peau, les muqueuses, les cellules de l'immunité innée qui comprennent notamment les polynucléaires neutrophiles, les macrophages

et les cellules dendritiques agissant par phagocytose. Des mécanismes d'inflammation rentrent aussi en jeu ainsi que le système du complément qui agit par lyse directe du microorganisme, facilite la phagocytose ou initie la réaction inflammatoire (figure 7) (Granier, C. 2016).



**Figure 7.** Les cellules immunitaires innées engagées pour renforcer l'immunité antitumorale pour l'immunothérapie (Li, X et al. 2021).

Un ensemble diversifié de récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) détectent les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP), les modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) ou les antigènes associés aux tumeurs (TAA) et activent les cellules immunitaires innées au sein du TME. Ces capteurs peuvent également être exprimés par les cellules tumorales elles-mêmes. Plusieurs PRR, dont cGAS/STING, RIG-I et TLR, favorisent la transcription de gènes pro-inflammatoires via IRF-3 et NF-κB. Ces processus entraînent la production d'IFN de type I, de cytokines et de chimiokines, qui favorisent une réponse antitumorale cytotoxique médiée par les lymphocytes T effecteurs et les cellules NK. De plus, les cellules dendritiques produisent CXCL-9 et CXCL-10, qui sont deux chimiokines essentielles pour l'infiltration de lymphocytes T CD8 dans la tumeur et l'activité destructrice de

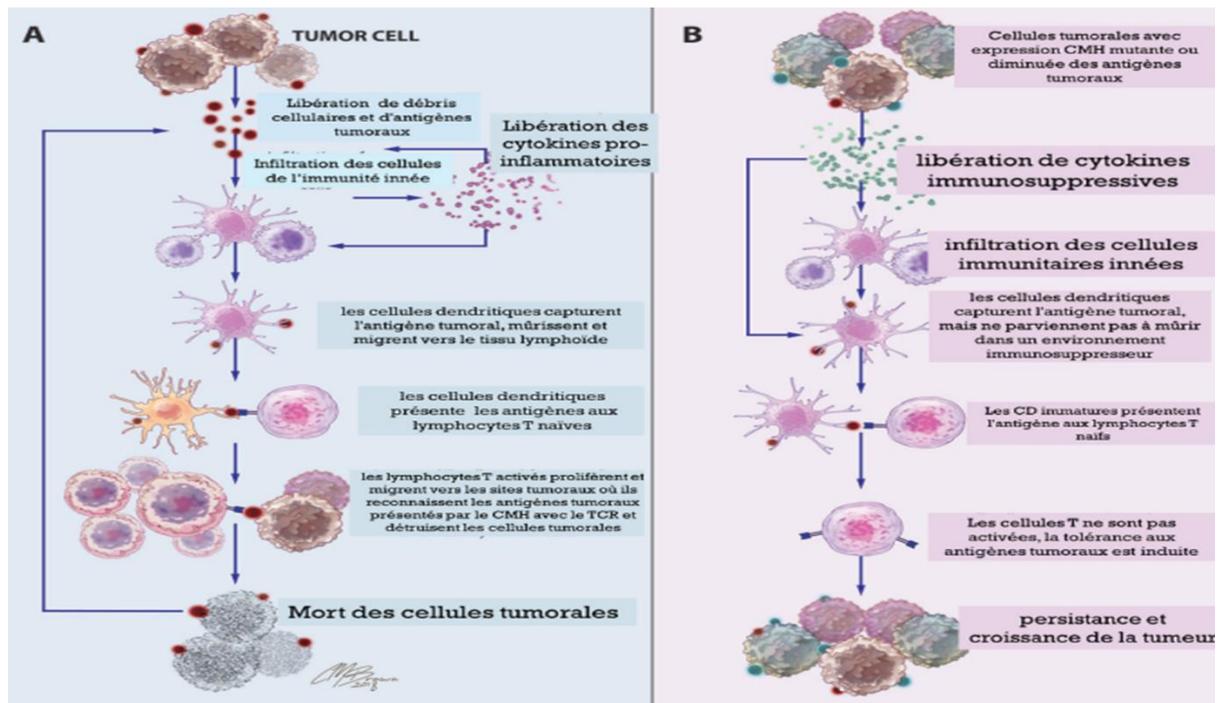
ces cellules ; ces chimiokines induisent également le recrutement de cellules NK, qui peuvent soutenir les réponses des lymphocytes T. En conséquence, les cellules NK produisent un éventail de cytokines et de chimiokines qui régulent les réponses immunitaires. Grâce à la libération de CC-chimiokine ligand 5 (CCL5), FLT3L, XC-chimiokine ligand 1 (XCL1) et XCL2, les cellules NK favorisent le recrutement de cellules dendritiques (CD) dans les tumeurs solides. Enfin, les cellules CAR NK et les macrophages CAR peuvent tuer directement les cellules cancéreuses et faciliter la présentation de l'antigène pour faire face à l'hétérogénéité tumorale. Les cellules CAR NK peuvent induire l'apparition précoce d'une activité antitumorale, suivie du recrutement de cellules T par le biais de chimiokines (Li, X et al. 2021).

### **1.2- Immunité adaptative**

L'immunité adaptative ou acquise est plus lente à se mettre en place, elle nécessite que les cellules immunitaires, et plus précisément les lymphocytes, aient déjà rencontré l'agent pathogène à détruire et soient éduqués pour l'éliminer. Cette immunité comprend les lymphocytes B qui produisent les anticorps et les lymphocytes T qui sont activés et éduqués par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), pour cela les CPAs entrent en contact avec un lymphocyte non éduqué dans les ganglions lymphatiques, elles lui présentent l'antigène qui est une protéine issue d'un agent pathogène. Le lymphocyte devient alors immunocompétent, c'est-à-dire qu'il reconnaît spécifiquement cet antigène, c'est la sélection clonale. Lors d'un nouveau contact entre ce lymphocyte et l'antigène va s'activer et se multiplier, c'est l'amplification clonale. Parmi les lymphocytes T, on distingue les lymphocytes T CD4 qui aident les lymphocytes B à produire des anticorps et les lymphocytes T CD8 qui vont se fixer sur la cellule infectée et vont reconnaître l'antigène présent à sa surface puis ils libèrent des cytotoxines qui vont créer des lésions dans la membrane de la cellule infectée et ainsi la détruire (Granier, C. 2016).

### **1.3- Le cycle immunitaire antitumoral**

Lorsque le système immunitaire est confronté à une cellule cancéreuse, il réagit en plusieurs étapes. On peut modéliser ces étapes à travers un cycle immunitaire antitumoral. Lorsque ces étapes sont accomplies correctement, le système immunitaire combat efficacement le cancer. Lorsqu'au moins une des étapes est défectueuse, le cycle s'interrompt et la tumeur ne peut plus être détruite. Un troisième cas existe lorsque le système immunitaire arrive à stabiliser la tumeur et à empêcher sa prolifération mais pas à l'éliminer complètement, il s'agit de l'état d'équilibre entre le système immunitaire et les cellules tumorales (figure 8) (Mohammed, S et al 2016).



**Figure 8.** La réponse immunitaire dans le cas des tumeurs solides. A : la réponse antitumorale normale, B : La résistance et l'échappement à la réponse immunitaire antitumorale (Mohammed, S et al 2016).

## 2- Antigènes tumoraux

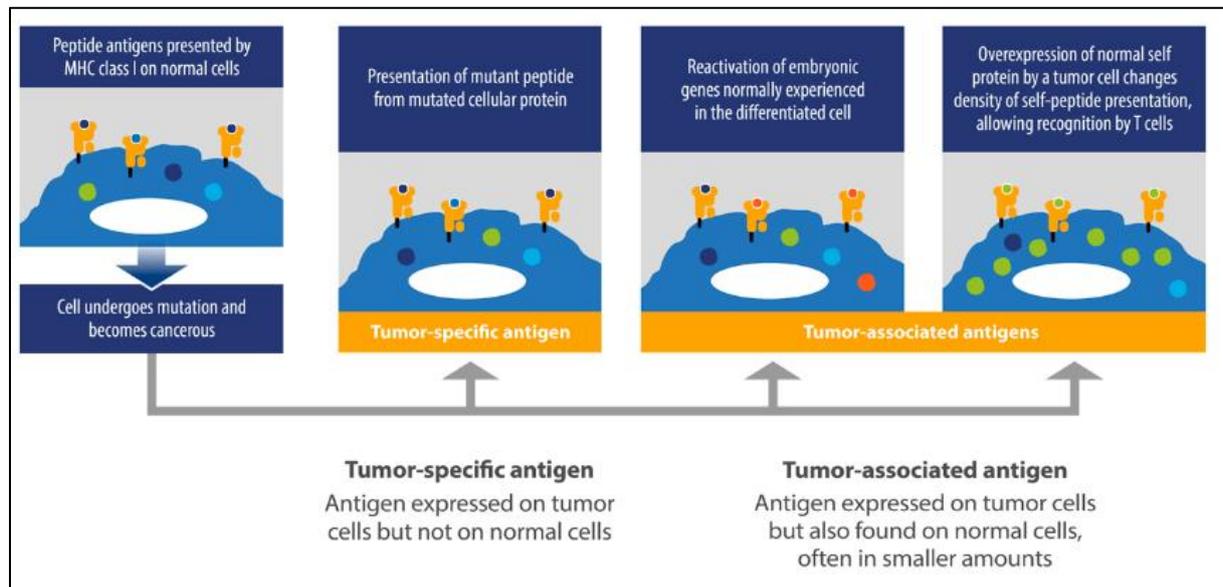
Il existe deux grandes classes d'antigènes tumoraux qui peuvent être exploitées pour les thérapies cellulaires T ; les antigènes partagés publics et les antigènes privés (également appelés néo-antigènes).

Les antigènes publics partagés sont communs à plusieurs patients et sont eux-mêmes divisés en deux autres catégories :

- Les antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA) : qui se trouvent sur les cellules cancéreuses mais pas sur les cellules saines.
- Les antigènes associés aux tumeurs (TAA) : qui ont des niveaux élevés dans les cellules tumorales, mais peuvent être exprimés par des cellules saines à des niveaux inférieurs.

Les néo-antigènes sont également appelés antigènes privés et sont spécifiques à un seul patient. Ce sont des peptides non-soi dérivés de mutations somatiques non synonymes propres aux cellules cancéreuses. L'avantage des néo-antigènes par rapport aux antigènes publics est

qu'ils ne sont pas passés par la sélection du thymus et que, par conséquent, le système immunitaire de l'hôte les identifie comme "non-soi" (figure 9) (Ann, E et al. 2019).



**Figure 9.** Les antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA) et les antigènes associés aux tumeurs (TAA) (Ann, E et al. 2019).

Il existe une autre classification des antigènes tumoraux basée sur leur structure moléculaire et leur source. En conséquence, ils peuvent être classés comme suit :

- **Produits de gènes mutés**

Les produits de gènes mutés (les oncogènes, les gènes suppresseurs des tumeurs et d'autres gènes) peuvent être reconnus comme étrangers par le système immunitaire et peuvent donc stimuler des réponses immunitaires spécifiques (Hamid, E. 2001).

- **Antigènes codés par des virus oncogéniques**

En général, dans un organisme immuno-compétent les cellules infectées exprimant les protéines virales sont reconnues comme étrangères et sont éliminées. Le développement des tumeurs est ainsi généralement contrôlé. En présence d'immunodéficience, le risque de développer ce type de cancers est très augmenté (Hamid, E. 2001).

- **Antigènes de différenciation**

Les cellules cancéreuses expriment des antigènes caractéristiques du tissu d'origine qui sont des cibles potentielles d'une réponse immunitaire. Ces antigènes peuvent ou non être spontanément immunogéniques. Le caractère plus ou moins essentiel de l'organe exprimant

l'antigène détermine leur utilisation potentielle comme cibles d'une réponse immunitaire antitumorale (**Hamid. E. 2001**).

- **Antigènes onco-fœtaux**

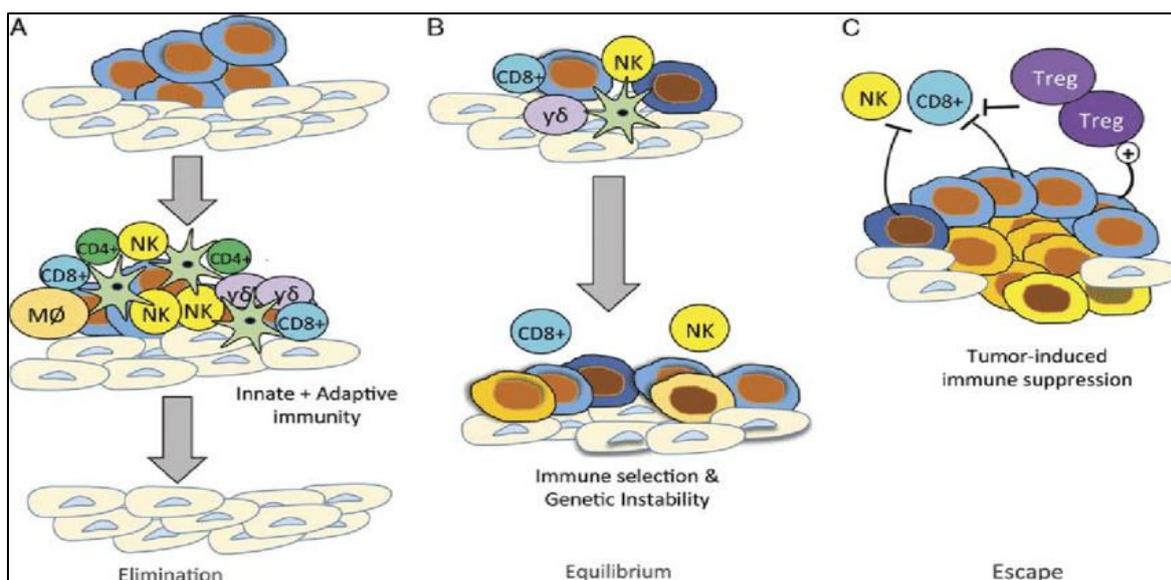
Comme l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) et l'alphafoetoprotéine (AFP). Ces protéines sont normalement exprimées à des niveaux élevés aux stades précoces du développement (vie fœtale) et à des niveaux beaucoup plus bas chez l'adulte. Elles sont augmentées chez les patients cancéreux mais aussi dans certaines pathologies non malignes. Leur immunogénicité semble limitée. Leur valeur comme marqueurs tumoraux est néanmoins importante (**Hamid, E. 2001**).

- **Antigènes surexprimés**

Ils sont issus de protéines ubiquitaires et sont les plus nombreux. Ces antigènes sont faiblement exprimés par les cellules normales mais fortement exprimés par les cellules tumorales suite à des dérégulations au niveau de la transcription ou de la traduction. Un exemple est l'antigène Her2 qui a une activité oncogénique, et qui est normalement exprimé à des niveaux très bas dans les tissus sains et est surexprimé dans une fraction des cancers du sein et de l'ovaire (**Hamid E, 2001**).

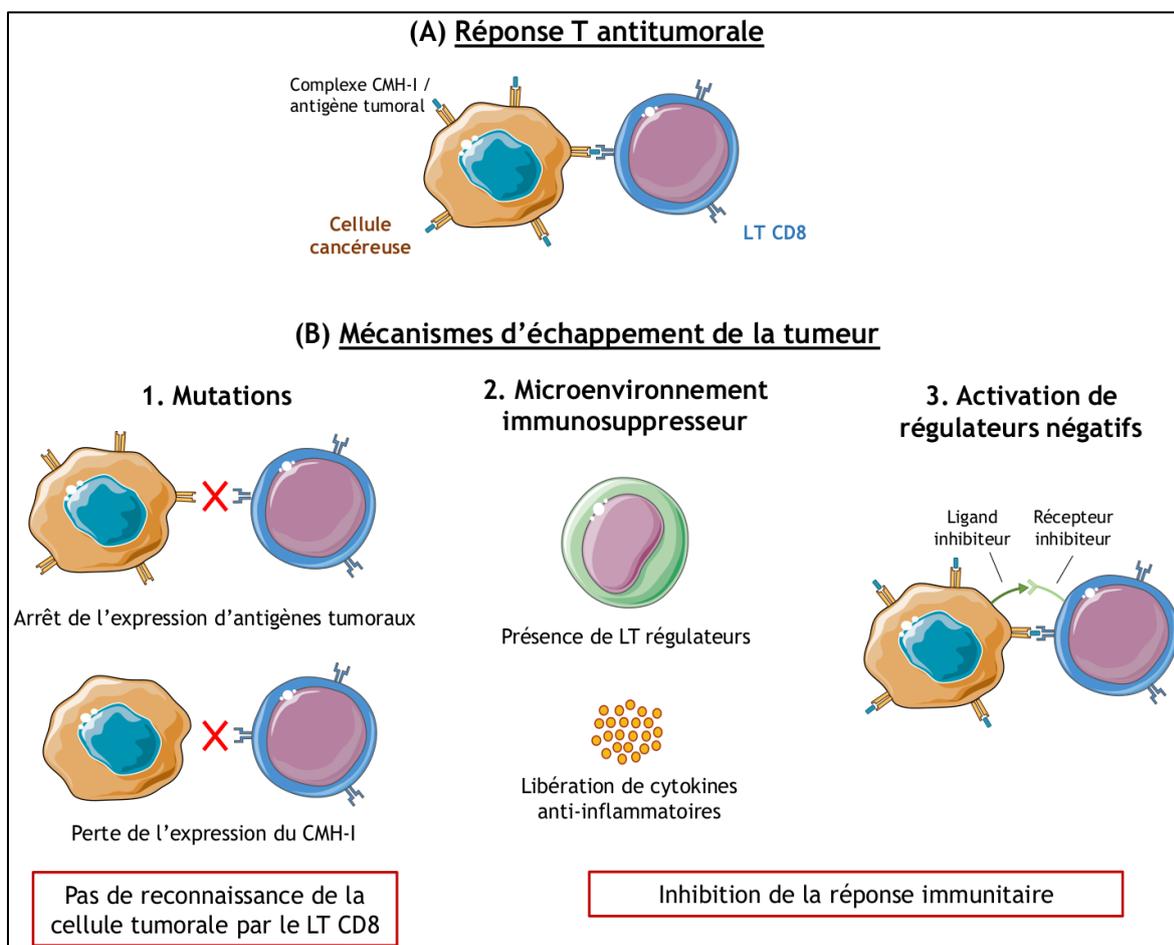
### 3- Immunosurveillance antitumorale

Il existe trois grandes étapes dans l'interaction entre la cellule cancéreuse et le système immunitaire, on parle d'immunosurveillance ou de "théorie des 3E" (Figure 10).



**Figure 10.** Le phénomène d'immunosurveillance adapté (**Mohammed, S et al 2016**).

La réponse immunologique au développement d'un cancer peut varier considérablement d'un cas à l'autre. A : Dans de nombreux cas, le cancer naissant est totalement éliminé par la réponse immunologique composée de cellules tueuses naturelles et de lymphocytes T cytotoxiques. B : Dans certains cas, la réponse immunologique stabilise la tumeur, mais est incapable de l'éliminer complètement (équilibre). C : Certains cancers sont capables de bloquer la réponse immunitaire et de progresser. Les cellules tumorales produisent plusieurs cytokines qui bloquent l'action des lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules tumorales recrutent également des cellules T régulatrices (T-regs), qui améliorent le microenvironnement immunosuppresseur à l'intérieur et autour de la tumeur (figure 11) (Mohammed, S et al 2016).



**Figure 11.** Mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire (Servier Medical Art).

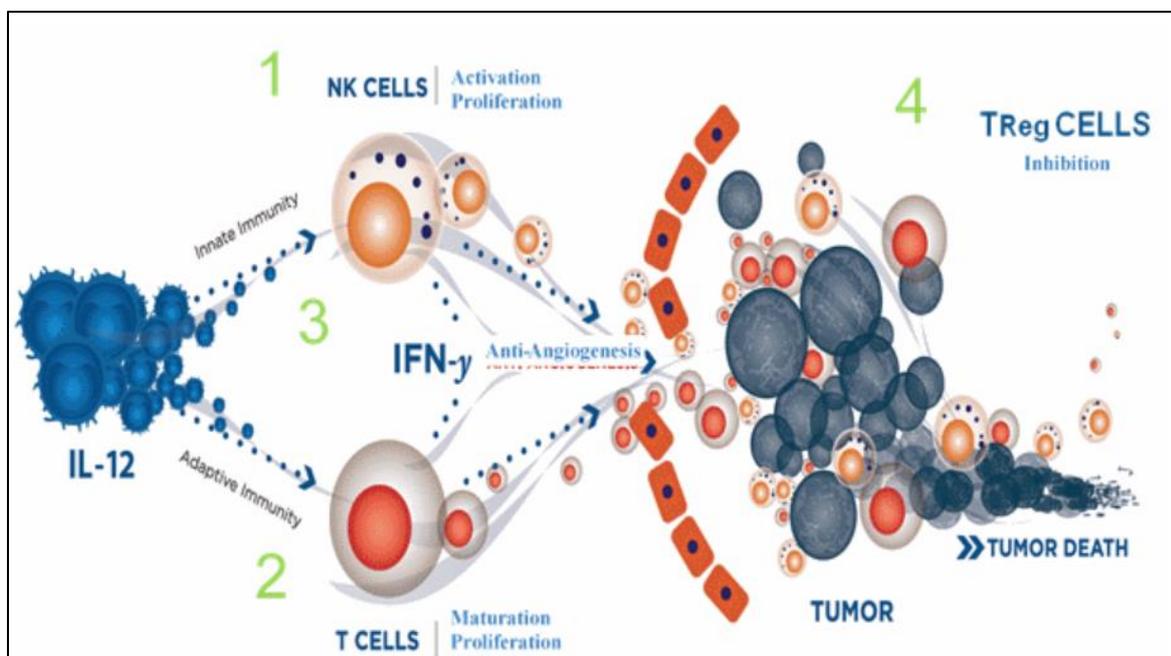
A : Lors de la phase d'immunosurveillance de la tumeur, une réponse T antitumorale est mise en place suite à la reconnaissance de la cellule tumorale par les lymphocytes T CD8. Au niveau moléculaire, cette reconnaissance passe par l'interaction entre les antigènes tumoraux présentés par le CMH I des cellules tumorales et le TCR des lymphocytes T. Ceux-ci sont alors capables

d'éliminer les cellules cancéreuses grâce à leurs fonctions effectrices. B : Lors de la phase d'échappement, différents mécanismes limitent la réponse immunitaire :

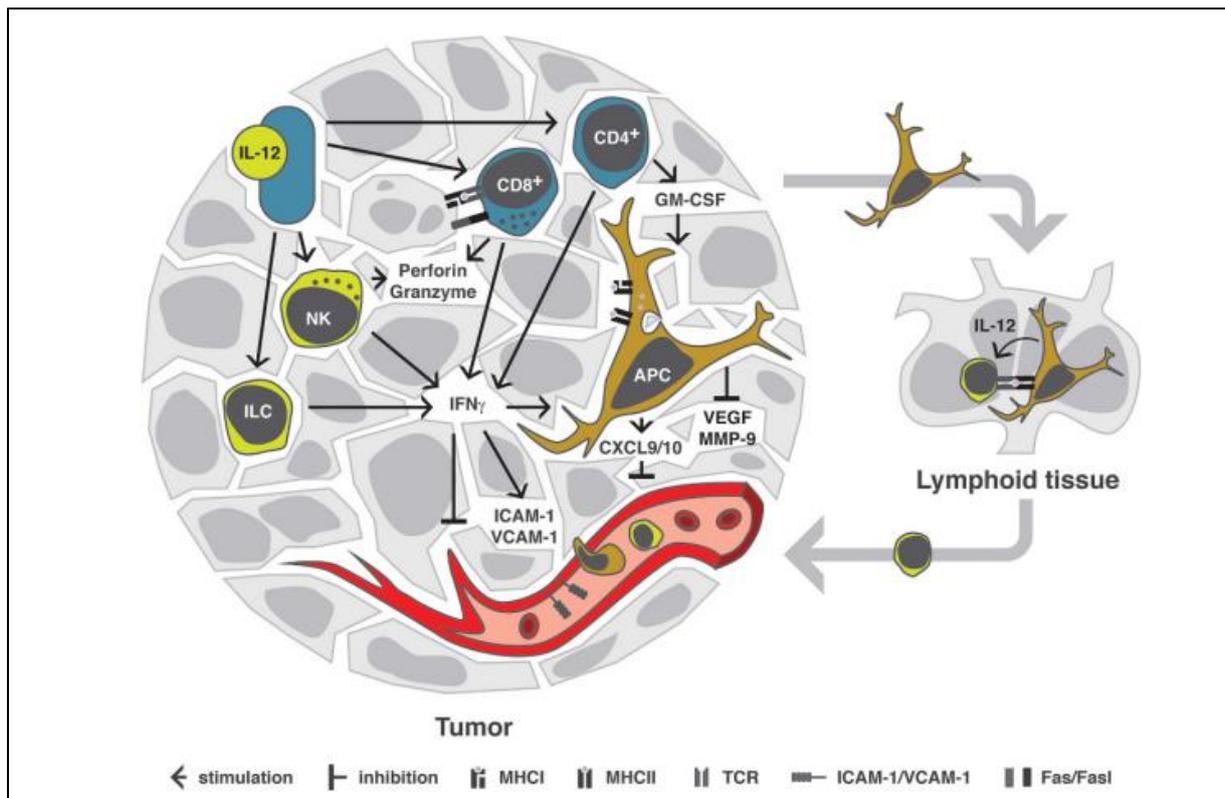
1 : Les cellules tumorales subissent des mutations, pouvant conduire à une perte de l'expression des antigènes tumoraux ou des molécules de CMH I. Les cellules cancéreuses ne peuvent alors plus être reconnues par les lymphocytes T CD8. 2 : Au sein de la tumeur, un microenvironnement suppresseur est mis en place, composé notamment de lymphocytes T régulateurs et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. Ces cellules et molécules inhibent la réponse immunitaire. 3 : Les cellules tumorales expriment à leur surface des ligands inhibiteurs (ex : PD-L1), pouvant se lier à des récepteurs inhibiteurs (ex : PD-1) exprimés par les lymphocytes T CD8 activés. L'activité de ces derniers est alors inhibée, et ces cellules meurent par apoptose (Mathilde, C. 2021).

#### 4- La biologie de l'interleukine 12

L'interleukine-12 (IL-12) est une cytokine hétérodimérique au large spectre d'activités biologiques, son rôle principal est de potentialiser l'activité cytotoxique et de participer à la régulation de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Elle induit la production de l'IFN- $\gamma$ , et favorise la différenciation des cellules auxiliaires de type Th-1. Elle est impliquée dans la surveillance immunologique antitumorale : du fait de sa capacité d'induire une réponse immune efficace contre des tumeurs peu immunogènes (figure 12 et 13) (Elia, D et al. 2019).



**Figure 12.** L'interleukine-12 a plusieurs mécanismes d'action distincts qui conduisent à la mort des cellules tumorales (Premal, T et al 2016).



**Figure 13.** Réponses cellulaires à la stimulation de l'IL-12 dans le tissu tumoral (Tugues, S et al 2015).

L'IL-12 agit principalement sur les cellules lymphoïdes telles que les cellules NK, les cellules T et les ILC. Tous ces sous-ensembles augmentent leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  lors de la stimulation et induisent ainsi la plupart des voies de suppression tumorale observées lors du traitement à l'IL-12. De plus, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  potentialisent les réponses cytotoxiques des cellules NK et des cellules T CD8, impliquant la production de perforine, de granzyme et de ligand Fas (FasL). L'IFN- $\gamma$  sécrété est impliqué dans les réponses vasculaires tumorales directes telles que la régulation à la hausse d'ICAM-1 et de VCAM-1 et l'inhibition de l'angiogenèse. On pense que la régulation à la hausse de la molécule d'adhésion facilite le recrutement des leucocytes dans le tissu tumoral. De plus, IFN- $\gamma$  stimule les cellules myéloïdes, qui induisent la sécrétion de CXCL9 et CXCL10 et suppriment la production de VEGF et de MMP-9, entraînant l'inhibition de l'angiogenèse. De plus, l'IL-12 stimule la présentation de l'antigène et la présentation croisée par les APC et favorise ainsi davantage l'activité cytotoxique des cellules T CD8 et la réponse des cytokines des cellules T CD4. Il a également été démontré que le GM-CSF dérivé de lymphocytes T auxiliaires lors de la stimulation par l'IL-12 médie l'effet suppresseur de tumeur (Tugues, S et al 2015).

#### 4.1- La molécule et son récepteur

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique composée de sous-unités p40 et p35 liées par des ponts disulfures et est considérée comme une cytokine largement pro-inflammatoire. Il est produit par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, et les lymphocytes B et est crucial pour le recrutement et les fonctions effectrices des cellules T CD8<sup>+</sup> et NK (**Zundler, S 2015**). En outre, l'IL-12 participe dans l'établissement de l'immunité humorale en agissant sur les lymphocytes B (LB). Par conséquent, l'IL-12 est un contributeur majeur à des réponses immunitaires antitumorales efficaces (**Tugues, S 2015**).

Les récepteurs de l'IL-12, les chaînes IL-12R $\beta$ 1 (faible affinité, K<sub>d</sub> = 2–6 nM, 1000–5000 sites par cellule) et  $\beta$ 2 (haute affinité, K<sub>d</sub> = 5–20 pM, 100–1000 sites par cellule), sont principalement exprimés sur les cellules T et NK activées (**Desai, BB et al 1992**).

Dans les cellules B primaires humaines, Durali et al ont trouvé un récepteur fonctionnel de l'IL-12 (IL-12R) qui s'internalise après la liaison à l'IL-12. L'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 régulaient positivement la sous-unité IL-12R $\beta$ 2 mais n'avaient aucun effet sur l'IL-12R $\beta$ 1. L'IL-12 induit la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT4 tout en n'ayant aucun effet direct sur l'activation de STAT1 ou l'expression de T-bet (boîte T exprimée dans les cellules T) dans les cellules B primaires (**Durali, D et al. 2003**).

Ces résultats indiquent que les cellules B représentent une autre cible majeure pour l'IL-12 en plus des cellules T et NK, et que l'IL-12 peut affecter directement l'immunité humorale (**Liu, J et al. 2005**).

La transduction du signal par l'IL-12R induit la phosphorylation de la tyrosine principalement des kinases de la famille Janus JAK2 et TYK2 (**Bacon, CM et al. 1995**), qui à leur tour phosphorylent et activent STAT4. En plus de la phosphorylation de la tyrosine, il a été démontré que STAT4 est phosphorylé sur le résidu sérine en réponse à l'IL-12 (**Visconti, R et al. 2000**). La phosphorylation de la sérine STAT4 dépendante de l'IL-12 est médiée par la stimulation de la protéine kinase activée par le mitogène p38 (MAPK) via ses activateurs en amont, la MAPK kinase (MKK), l'arrêt de la croissance et les dommages à l'ADN inductibles (GADD) 45- $\beta$  et - $\gamma$  (**Morinobu, A et al 2002**). Il n'est pas médié par la stimulation des kinases extracellulaires régulées par le signal (ERK) 1/2 ou de la kinase c-Jun N-terminale (JNK). La phosphorylation de la sérine est nécessaire pour une activité transcriptionnelle complète de la production de STAT4 et d'IFN- $\gamma$ , mais pas pour la prolifération. De plus, il a été démontré que

la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt est activée par l'IL-12 et joue un rôle important dans la prolifération, mais pas dans la production d'IFN- $\gamma$  (Yoo, JK et al. 2002).

Dans les lymphocytes T CD4, l'activation de STAT4 par l'IL-12 est nécessaire pour la transcription de T-bet, un régulateur positif de la différenciation cellulaire Th1. T-bet améliore l'expression des cytokines spécifiques à Th1, des chimiokines et des récepteurs associés à Th1. T-bet seul peut réguler positivement l'expression de l'IFN- $\gamma$ , tandis qu'en combinaison avec STAT4, il améliore la transcription de CXCR3, IL-12R $\beta$ 1, CCL3 et CCL4 (Thieu, VT et al 2008 et Jenner, RG et al 2009). CCL3 et CCL4 sont nécessaires au recrutement intra-tumoral des cellules NK cytotoxiques et des lymphocytes T CD8 (Allen, F. 2017). En présence d'IL-12, les cellules NK sont activées, expriment CD69 et CD25 et peuvent encore proliférer dans la niche tumorale (Zwirner, N.W et al 2017). Les cellules Th1 et NK activées prolifèrent et s'infiltrent dans la tumeur, où les cellules Th1 soutiennent les fonctions effectrices des cellules T cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Zwirner, N.W et al. 2017 et Zundler, S et al 2015). L'IFN- $\gamma$ , la granzyme et la perforine sécrétés par les NK et T CD8+ cytotoxiques peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses et contrôler la croissance tumorale (Allen, F et al 2017).

De plus, l'IL-12 facilite la présentation de l'antigène en régulant à la hausse le CMH-I sur les cellules tumorales, en favorisant la polarisation vers les macrophages M1 et en attirant les cellules immunitaires effectrices en augmentant la production des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (Tugues, S et al 2015).

De plus, T-bet et STAT4 agissent comme des régulateurs négatifs pour ROR $\gamma$ t et Foxp3, facteurs de transcription responsables respectivement de la génération de Th17 et de Treg, et limitent leur prolifération dans le microenvironnement tumoral (TME) (Lazarevic, V et al 2011).

L'IL-12 peut également neutraliser la signalisation par des récepteurs régulateurs négatifs sur les lymphocytes T CD8. Par exemple, l'IL-12 régule à la baisse l'expression de PD-1 et d'IFN $\gamma$ R2 sur les lymphocytes T CD8, protégeant ainsi les lymphocytes T CD8 infiltrant la tumeur contre la mort cellulaire induite par l'IFN  $\gamma$  (Lin, L. et al 2019). L'activation de l'immunité antitumorale par l'anti-PD1 nécessite une diaphonie médiée par l'IL-12 entre les cellules T et les cellules dendritiques qui permet de tuer les cellules tumorales médiées par les lymphocytes T CD8 (Garris, C.S et al 2018).

Outre sa fonction dans les cellules immunitaires effectrices, l'IL-12 modifie la plasticité des cellules Treg différenciées en phase terminale en convertissant les cellules Treg Foxp3+ en cellules T Foxp3+ productrices d'IFN- $\gamma$ . Le traitement par l'IL-12 diminue le niveau d'IL-2, qui est nécessaire pour la survie et l'expansion des cellules Treg. Il a été démontré que l'IL-12 stimule l'inhibition médiée par l'IFN $\gamma$  de l'expansion des cellules Treg chez la souris. Mécaniquement, la signalisation IFN- $\gamma$  induite par l'IL-12 provoque l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules Treg et inhibe la prolifération des cellules Treg induite par la tumeur (**Cao, X et al 2009**).

Ces études démontrent que l'IL-12 est non seulement nécessaire à l'activation des réponses immunitaires antitumorales effectrices, mais peut également inhiber directement la suppression immunitaire. Ainsi, l'utilisation de l'IL-12 comme immunothérapie du cancer pourrait être bénéfique pour contrôler la croissance tumorale en activant les réponses immunitaires cytotoxiques antitumorales. Dans l'ensemble, l'IL-12 cible et module les lymphocytes T, les cellules NK et les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui régulent le devenir de la réponse immunitaire antitumorale contre les cellules cancéreuses (**Mirlekar, B et al 2021**).

### **III. Immunothérapie**

#### **1- Les différentes classes de l'immunothérapie**

L'immunothérapie consiste à traiter le cancer en utilisant le système immunitaire. Si celui-ci n'arrive pas à éliminer la tumeur, l'immunothérapie vise alors à induire une réponse en éduquant les acteurs de l'immunité antitumorale. Si la réponse immunitaire antitumorale est insuffisante pour éliminer la tumeur, l'immunothérapie a pour objectif d'augmenter la réponse.

Différentes techniques existent, afin de répondre à ces objectifs :

- L'immunothérapie passive consiste à administrer des molécules ou cellules du système immunitaire pour augmenter la réponse immunitaire préexistante (ex : anticorps monoclonaux, cellules CAR-T) ;
- L'immunothérapie active correspond à la mise en place, ou à la stimulation, de la réponse immunitaire antitumorale du patient (ex : cytokines, vaccination...).

### **1.1- Les cytokines**

Les cytokines permettent la signalisation et la communication au système immunitaire. En particulier, il a été démontré que les cytokines de la famille des interférons et des interleukines sont capables d'activer la réponse antitumorale. Les premières études utilisant ces molécules dans des procédés d'immunothérapie ont été réalisées dans les années 1980, et ces traitements sont désormais prescrits dans les cas de leucémies ou de lymphomes pour l'interféron- $\alpha$ , ou de cancers du rein ou de mélanomes pour l'interleukine-2. Ces traitements ont toutefois l'inconvénient d'être peu spécifiques, et entraînent donc de nombreux effets secondaires (inflammation à l'origine de fortes fièvres, nausées...). Ils sont ainsi peu utilisés en pratique, car ils nécessitent un suivi lourd du patient par une équipe soignante dédiée, afin de contrôler et limiter cette toxicité secondaire. (Mathilde, C 2021).

### **1.2- Anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits par un clone, c'est-à-dire une même lignée de lymphocytes B, et qui ciblent donc un seul et unique antigène. Au laboratoire, ces molécules sont produites à partir d'hybridomes (cellules issues de la fusion de lymphocytes B avec des cellules de myélome) qui présentent les propriétés des deux types cellulaires fusionnés, à savoir la production d'anticorps pour le lymphocyte B, et la forte prolifération et l'immortalité de la cellule de myélome. Les hybridomes formés sont cultivés in vitro et triés, afin de ne garder que ceux d'intérêt, produisant les anticorps monoclonaux souhaités (récupérables dans le surnageant de culture) (Georges, K. et al 1984).

Les anticorps monoclonaux sont utilisés depuis plus de vingt ans en immunothérapie, afin de cibler et d'inhiber soit des molécules en surface des cellules tumorales favorisant leur croissance, soit des molécules régulant négativement le système immunitaire.

- **Anticorps monoclonaux ciblant les cellules cancéreuses**

Exemple n°1 : Le premier anticorps monoclonal développé le rituximab, est utilisé pour traiter certains lymphomes (des cancers caractérisés par la prolifération des lymphocytes). Dans le cas des lymphomes à lymphocytes B, les plus fréquents, le rituximab permet de cibler la molécule CD20 exprimée par ces cellules, ce qui entraîne une toxicité.

Exemple n°2 : Chez environ 15 % des femmes atteintes de cancer du sein, les cellules tumorales expriment fortement la protéine Her2, un récepteur impliqué dans le développement de l'épithélium mammaire. Une immunothérapie basée sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal

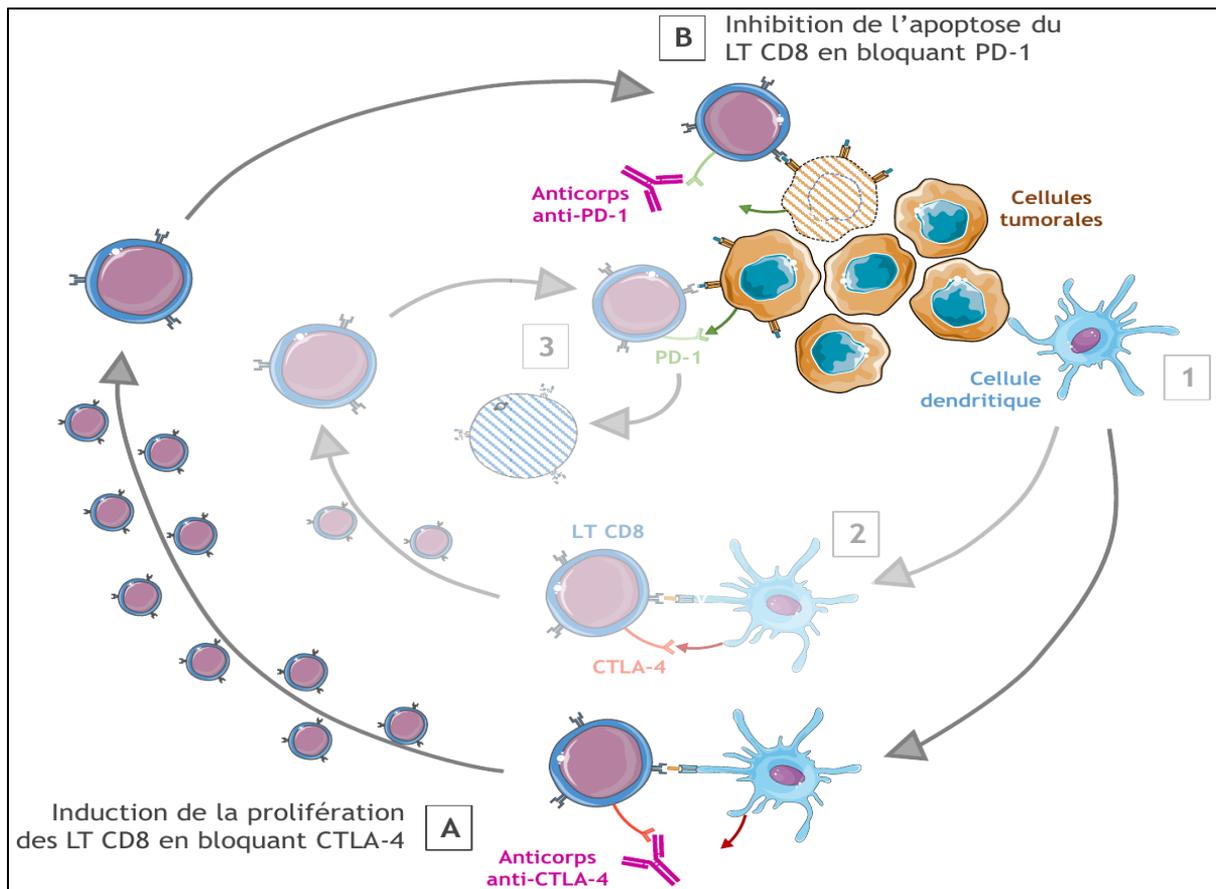
anti-Her2 (le trastuzumab) est utilisée depuis le début des années 2000 pour bloquer l'activité de ce récepteur et limiter le développement de la tumeur. Cette thérapie est plutôt efficace et permet d'augmenter d'en moyenne cinq ans l'espérance de vie des patientes traitées (**Hugo.H, et al**).

- **Anticorps monoclonaux immunomodulateurs**

Ces anticorps monoclonaux ciblent et inhibent des points de contrôle du système immunitaire, à savoir des molécules de surface contrôlant l'activation ou l'inhibition des réponses immunitaires adaptatives (Figure 14).

Exemple n°1 : La molécule CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) bloque normalement la prolifération des lymphocytes T après un certain temps d'interaction de ces cellules avec les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 (l'ipilimumab) permet de bloquer cette molécule et d'induire ainsi la multiplication des lymphocytes T. Ce traitement s'est démontré efficace dans la prise en charge de certains mélanomes, pour lesquels il n'existait alors que peu d'autres thérapies. Après traitement à l'ipilimumab, la maladie est en effet contrôlée sur le long terme, entraînant une augmentation de l'espérance de vie des patients de quelques années (au moins trois ans) (figure 14).

Exemple n°2 : Le récepteur PD-1 exprimé en surface des lymphocytes T est une molécule inhibitrice limitant la suractivation des réponses T au sein des tissus périphériques. En cas de cancer, les cellules tumorales expriment son ligand PD-L1. L'interaction PD1/PD-L1 entraîne l'apoptose des lymphocytes T. Des anticorps bloquant anti-PD-1 (le pembrolizumab, ou le nivolumab) ont été développés afin d'inhiber l'activité de PD-1, et ainsi d'empêcher l'apoptose des lymphocytes T. Ce traitement, utilisé chez des patients atteints de mélanomes ou de cancers du rein ou du poumon s'est montré efficace : la tumeur régresse de façon durable, et la qualité de vie des patients est augmentée de quelques années (figure 14) (**Hugo, H. et al**).



**Figure 14.** Action des anticorps monoclonaux immunomodulateurs (Servier Medical Art).

En l'absence de traitement (voie représentée en transparence), le système immunitaire reconnaît les cellules tumorales (1). Toutefois, des points de contrôle peuvent parfois être activés, bloquant l'activation et la prolifération des cellules immunitaires (2). Ces points de contrôle sont parfois induits par les cellules tumorales elles-mêmes (3), pouvant entraîner la mort des lymphocytes impliqués. L'utilisation d'anticorps monoclonaux (voie représentée en couleurs vives) permet d'outrepasser l'activation des points de contrôle et l'inhibition du système immunitaire. Une première approche (A) consiste à bloquer la molécule CTLA-4, ce qui restaure la prolifération des lymphocytes T. Une seconde approche (B) consiste à bloquer le récepteur PD-1, ce qui empêche les lymphocytes T d'entrer en apoptose et leur permet de lyser les cellules tumorales (**Hugo.H, et al**).

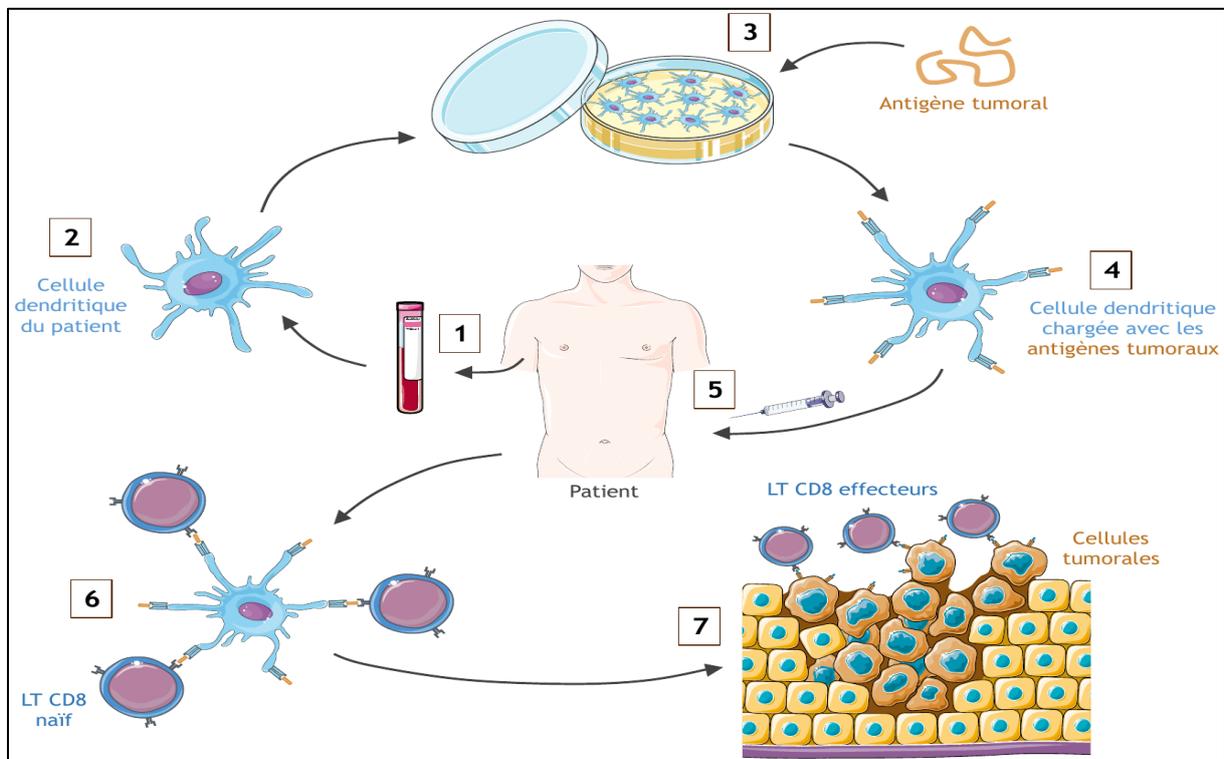
L'utilisation des anticorps monoclonaux présente toutefois quelques inconvénients. D'une part, des effets secondaires sont possibles, par exemple l'induction de réponses auto-immunes provoquant des dommages inflammatoires dans divers organes (peau, intestin, rein, poumon...). D'autre part, ces thérapies restent très coûteuses (de l'ordre de la dizaine de milliers de dollars par mois), et peu de patients répondent (20 à 40 % selon les cancers). La réponse au

traitement est d'ailleurs très difficile à prévoir, en raison d'une grande variabilité des cellules tumorales et de leur microenvironnement immunosuppresseur entre les patients (**Patrice, D. et al 2017**).

### 1.3- Vaccins thérapeutiques

Cette technique d'immunothérapie vise à déclencher une réponse immunitaire contre les cellules tumorales, en présentant au système immunitaire un antigène tumoral capable d'être reconnu et de déclencher une réponse efficace.

De nos jours, le seul vaccin thérapeutique commercialisé est le Sipuleucel-T, utilisé dans le cas du cancer de la prostate (Figure 15). La première étape de fabrication de ce vaccin consiste à prélever les cellules dendritiques du patient à partir d'un échantillon sanguin. Ces cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu qui contient l'antigène tumoral, la phosphatase acide prostatique, retrouvée dans 95 % des cancers de la prostate. Les cellules dendritiques capturent alors cet antigène puis le présentent par leur CMH. Les cellules dendritiques ainsi activées sont ensuite réinjectées chez le patient, où elles vont pouvoir activer les lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques. Afin d'être efficace, ce processus doit être renouvelé trois fois, à deux semaines d'intervalle (figure 15) (**Brun, J.-L 2008**).



**Figure 15.** Principe des vaccins thérapeutiques (Servier Medical Art).

Un échantillon de sang est prélevé au patient (1) puis les cellules dendritiques sont isolées (2) et cultivées in vitro avec des antigènes spécifiques des cellules cancéreuses du patient (3). Cela induit l'activation des cellules dendritiques, qui expriment à leur surface les antigènes tumoraux (4). Une fois réinjectées chez le patient (5), les cellules dendritiques présentent les antigènes aux lymphocytes T CD8 naïfs dans les ganglions lymphatiques (6). Ces derniers sont alors activés, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T CD8 effecteurs, qui migrent jusqu'au site de la tumeur pour y éliminer les cellules tumorales présentant les antigènes ciblés (7) (**Mathilde, C. 2021**).

Cette technique d'immunothérapie a pour avantage de ne provoquer que très peu d'effets secondaires, à part une légère inflammation au site d'injection. De plus, une réponse T mémoire est mise en place suite à la vaccination, limitant potentiellement les rechutes.

- **Les vaccins prophylactiques**

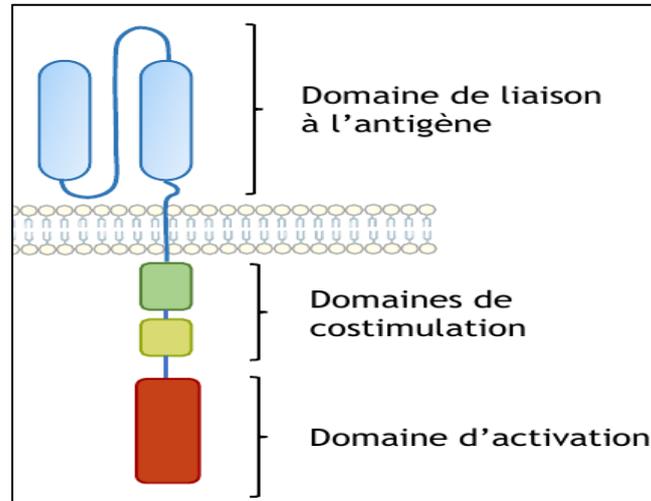
En parallèle des vaccins thérapeutiques, utilisés pour traiter les personnes atteintes d'un cancer, il existe des vaccins prophylactiques permettant de prévenir la survenue d'un cancer, tels que les vaccins contre les papillomavirus (virus responsables, entre autres, du cancer du col de l'utérus chez la femme). Ces vaccins font appel à des pseudo-particules virales, de structure quasiment identique à celle du virus sauvage, mais dépourvues de matériel génétique. Cette absence de matériel génétique prive ces particules de tout pouvoir infectieux et oncogène. La protéine virale utilisée pour construire la particule est spécifique du type de papillomavirus ciblé ; en fonction des vaccins, entre deux et neuf types de pseudo-particules virales sont utilisées, ce qui rend ces vaccins polyvalents en leur permettant de cibler différentes souches de papillomavirus.

Après injection, les pseudo-particules virales induisent une réponse immunitaire adaptative, et notamment la production d'anticorps par les lymphocytes B, qui diffusent et se concentrent dans l'épithélium vaginal. Ainsi, en cas d'infection par un papillomavirus, la présence de ces anticorps neutralise le virus et l'empêche d'infecter ses cellules cibles (**Brun, J.-L. 2008**).

### **1.1- Thérapie cellulaire : l'exemple des cellules CAR-T**

Les cellules CAR-T (pour chimeric antigenic receptor, ou « récepteur antigénique chimérique » en français) sont fabriquées en ajoutant un récepteur chimérique à des lymphocytes T du patient. Ces récepteurs chimériques, fabriqués sur-mesure, ciblent un

antigène tumoral d'intérêt, induisant l'activation des lymphocytes T (figure16) (Catros, V. 2019).



**Figure 16.** Structure générale des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) (Servier Medical Art).

Les récepteurs CAR (Chimeric Antigenic Receptors) sont classiquement constitués de trois domaines : un domaine de liaison à l'antigène, un ou deux domaine(s) de costimulation, et un domaine d'activation.

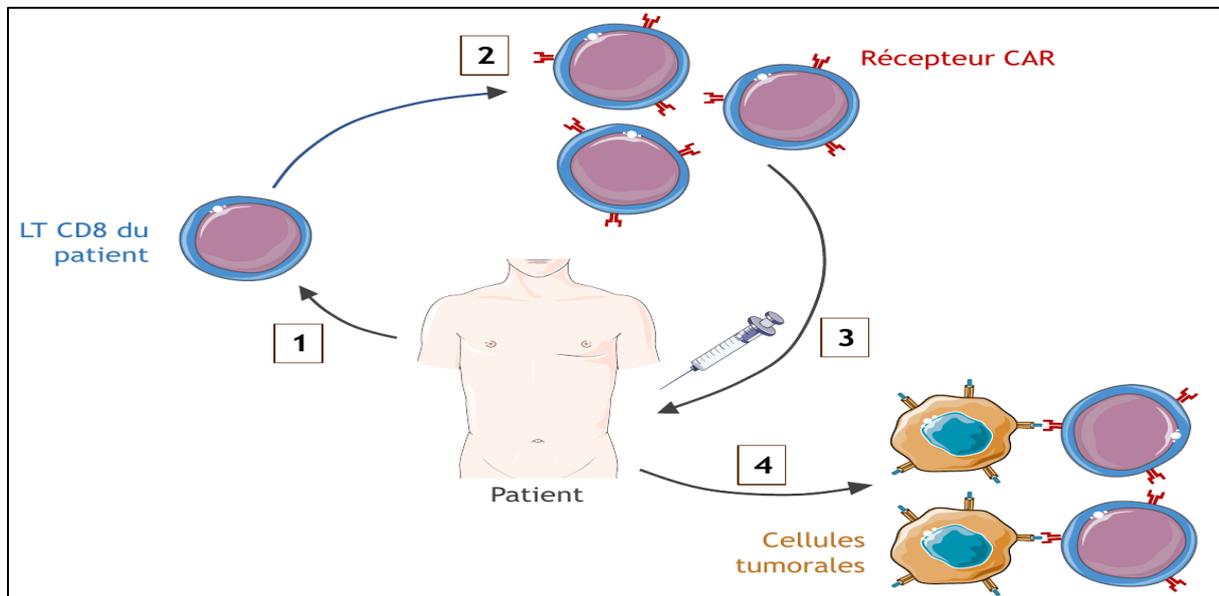
Ils sont classiquement constitués de trois domaines (Figure 5) :

- Un domaine de liaison à l'antigène, qui est dérivé de la partie variable d'un anticorps et qui permet ainsi une reconnaissance non restreinte au CMH, ce qui est un avantage car l'expression de cette molécule est souvent diminuée sur les cellules tumorales.
- Un domaine d'activation du lymphocyte T, qui correspond au domaine de signalisation intracellulaire du TCR.
- Un ou deux domaines de costimulation, dont le domaine intracellulaire du corécepteur CD28, ce qui permet l'activation du lymphocyte T même en l'absence de signaux co-stimulateurs dans l'environnement.

Différentes générations de cellules CAR-T ont été développées afin d'améliorer leur efficacité contre les tumeurs. Par exemple, certaines cellules CAR-T de quatrième génération sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires, tandis que d'autres n'expriment pas de molécules co-inhibitrices ce qui leur permet de mieux faire face à l'environnement immunosuppresseur au sein de la tumeur. Ces modifications des récepteurs permettent un

meilleur contrôle de la multiplication des cellules CAR-T, en parallèle d'améliorer leurs fonctions.

Pour fabriquer les CAR-T, des lymphocytes T sont prélevés chez le patient puis modifiés génétiquement *in vitro* par ajout d'un gène codant le récepteur chimérique d'intérêt. Pour cela, les lymphocytes T sont infectés avec un virus bénin modifié (des vecteurs lentiviraux ou rétroviraux), codant la molécule complète du récepteur antigénique chimérique d'intérêt. Lors de l'infection, l'entrée puis l'expression de l'ARN viral dans le lymphocyte T lui permet alors d'exprimer le récepteur chimérique à sa surface. Les cellules CAR-T ainsi générées sont cultivées *in vitro* pour les faire se multiplier, puis réinjectées chez le patient où elles vont pouvoir cibler les cellules tumorales et les éliminer (figure 17) (Catros, V. 2019).



**Figure 17.** Mode d'emploi des cellules CAR-T (Servier Medical Art).

Pour fabriquer les cellules CAR-T, des lymphocytes T sont prélevés chez le patient (1). Ces cellules sont modifiées génétiquement *in vitro* pour leur ajouter le gène codant le récepteur chimérique d'intérêt, puis cultivées afin de permettre leur multiplication (2). Les cellules CAR-T ainsi fabriquées sont réinjectées chez le patient (3), où elles vont pouvoir reconnaître et éliminer les cellules tumorales (4).

### 1.5- Associer l'immunothérapie à la virothérapie

La virothérapie est une méthode basée sur l'utilisation de virus oncolytiques, c'est-à-dire de virus capables d'infecter et d'éliminer les cellules tumorales (exemples : virus herpès simplex, adénovirus, virus de la rougeole). Cette méthode a déjà été testée sur plusieurs types

de cancers, et les résultats sont prometteurs. Par exemple, lors d'un essai clinique réalisé en 2013 sur des patients atteints d'un mélanome métastatique traités avec un virus herpès simplex génétiquement modifié, le mélanome a disparu chez 11 % des patients, et les patients ont gagné en moyenne quatre mois d'espérance de vie.

La virothérapie présente plusieurs intérêts. Tout d'abord elle est spécifique et entraîne donc peu d'effets secondaires, car les virus ciblent uniquement les cellules cancéreuses. Dans le cas du virus de la rougeole par exemple, cette spécificité provient du fait que les récepteurs et corécepteurs à ce virus sont fortement exprimés par les cellules cancéreuses. De plus, ces cellules peuvent présenter des anomalies dans la voie des interférons de type I, qui protègent normalement les cellules des infections virales. Deuxièmement, la virothérapie provoque avec une forte efficacité la mort des cellules cancéreuses, que celle-ci intervienne par apoptose ou suite à la lyse des cellules lors de la libération des virions. De plus, le fait que les virus ciblent plusieurs processus cellulaires à la fois empêche l'apparition de résistances au traitement. Les virus utilisés peuvent par ailleurs être modifiés génétiquement pour renforcer leur spécificité vis-à-vis des cellules tumorales ou pour leur conférer d'autres propriétés anticancéreuses (par exemple en améliorant leur capacité à amplifier la réponse immunitaire). Enfin, l'utilisation de virus présente pour avantage de favoriser le recrutement de cellules immunitaires sur le site de la tumeur, en réponse à l'infection (**Waldman, A. et al. 2020**).

La virothérapie est donc une méthode encourageante pour limiter le développement de la tumeur. Grâce à son action sur le système immunitaire, cette technique pourrait notamment être employée en parallèle de traitements d'immunothérapie, pour stimuler la réponse immunitaire induite.

## **2- Immunothérapie par des cytokines**

L'activation ou l'inhibition des cellules du système immunitaire sont régulées par un ensemble de récepteurs et de facteurs solubles très divers. Tous ces éléments peuvent représenter des cibles thérapeutiques potentielles en oncologie. Il est également possible de stimuler les réponses immunitaires de type Th1 en injectant des cytokines recombinantes. En effet, ces dernières sont souvent essentielles dans l'initiation et le maintien d'une réponse immune efficace. En immunothérapie anticancéreuse, elles permettent d'amplifier la réponse immune cytotoxique en agissant sur les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules NK. La limitation principale de leur utilisation résulte de leurs effets pléiotropiques qui sont sources de nombreux effets indésirables (**Yoshimoto, T et al 2009**).

Trois cytokines essentielles dans les réponses immunitaires ont beaucoup été étudiées en oncologie : l'IFN- $\alpha$ , l'IL-2 et l'IL-12 :

- **L'interféron- $\alpha$**

C'est la cytokine qui est utilisée depuis longtemps en immunothérapie anticancéreuse. Son potentiel thérapeutique a été évalué dans plusieurs types de cancers solides et d'hémopathies malignes. Bien que ses indications soient plus restreintes aujourd'hui, l'IFN- $\alpha$  reste encore largement utilisé dans le traitement de certains cancers, comme les mélanomes métastatiques par exemple (**Rizza, Pet al, 2010**). Cette cytokine exerce deux types d'action sur les tumeurs. D'une part, comme les IFN de type II, elle agit directement sur les cellules cancéreuses en bloquant leur prolifération. D'autre part, elle joue un rôle activateur important dans les réponses immunes antitumorales. Pourtant négligé pendant longtemps, cet aspect de la bioactivité de l'IFN- $\alpha$  semble néanmoins plus important pour la réponse antitumorale. L'IFN- $\alpha$  possède un large spectre d'action. En effet, il participe à la différenciation des monocytes sanguins en CD8 et à leur activation, en augmentant l'expression des molécules du CMH de classe I à leur surface. De plus, l'IFN- $\alpha$  participe d'une manière générale aux réponses immunitaires de type Th1, notamment via son activité sur les lymphocytes T cytotoxiques CTLs. Ainsi, il a été montré que l'IFN- $\alpha$  participe *in vivo* à l'amplification et la survie à long-terme des CTLs en réponse à un Ag spécifique. En immunothérapie, l'IFN- $\alpha$  a aussi été testé en combinaison avec des vaccins peptidiques dans le traitement du mélanome métastatique. Son utilisation a été corrélée avec une augmentation importante des CTLs sanguins spécifiques des Ags du vaccin. Ces études démontrent l'intérêt de cette cytokine comme adjuvant en immunothérapie anti-cancéreuse. En revanche, les traitements incluant l'IFN- $\alpha$  s'accompagnent quasi-systématiquement de manifestations autoimmunes telles que thyroïdites, diabète de type I, hépatites ou encore vascularites (**Rosenberg, SA et al 2014**).

- **L'interleukine-2**

L'IL-2 est le facteur de croissance le plus important des lymphocytes T et des cellules NK. L'amplification de ces cellules par l'IL-2 peut être induite tant *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, l'IL-2 soutient aussi leur maturation et leurs fonctions effectrices. Il est donc tout à fait logique que cette cytokine soit utilisée depuis longtemps en immunothérapie anticancéreuse (**Rosenberg, SA et al 2014**). Son potentiel thérapeutique est réellement connu depuis les années 1980. En effet, dans une étude publiée en 1985, 25 patients atteints de tumeurs solides métastatiques, en échec thérapeutique avec d'autres traitements, ont été traités 131 avec des

doses croissantes d'IL-2 toutes les 8 heures. Ceci permettait de maintenir une concentration sérique efficace pour induire la réponse immunitaire antitumorale. Les doses s'échelonnaient de 60 000 IU/kg à 600 000 IU/kg. Parmi les 25 patients, 4/7 atteints de mélanomes métastatiques et 3/3 atteints de carcinomes rénaux ont montré des régressions tumorales partielles ou complètes. Certains de ces patients ont même été complètement guéris. Ce fut la première fois qu'une manipulation sur le système immunitaire dans un but thérapeutique permettait d'obtenir de tels résultats (**Rosenberg, SA et al 1985**). D'autres études cliniques ont suivi et ont montré des résultats encourageants. Ces études ont conduit la FDA à approuver l'usage thérapeutique de l'IL-2 recombinante dans le traitement des carcinomes rénaux métastatiques en 1992 et dans les mélanomes métastatiques en 1998 (**Rosenberg, SA et al 2014**).

Cependant, l'usage de l'IL-2 dans les thérapies reste limité en raison de sa forte toxicité intrinsèque, provoquant notamment fièvre, frissons, malaise et altération des fonctions hépatiques. Ces symptômes restent généralement sous contrôle avec les traitements adaptés. Ce qui pose plus de problèmes aux cliniciens est le syndrome de fuite capillaire engendré par cette cytokine. Ce syndrome se traduit par une oligurie, des œdèmes généralisés, des arythmies cardiaques et des hypotensions. Si le phénomène n'est pas contrôlé, des défaillances multi-organiques peuvent se produire, pouvant aller jusqu'à la mort du patient. Cette forte toxicité a obligé les cliniciens à envisager des traitements avec des doses d'IL-2 plus faibles, mais les résultats des essais cliniques ont clairement démontré le bénéfice des fortes doses d'IL-2 par rapport aux faibles doses. Ainsi, l'apparition de thérapies ciblées comme l'ipilimumab remet quelque peu en question son utilisation (**Rosenberg, SA et al 2014**).

### **3- Thérapie génique des cancers et spécificité**

Bien que de nombreuses stratégies de thérapie génique ont été développées pour traiter le cancer, un défi majeur a été de générer un vecteur d'administration génique systémique capable de cibler à la fois sélectivement et efficacement le tissu tumoral. À ce jour, la plupart des essais cliniques impliquaient l'injection intra tumorale, de systèmes de vecteurs viraux ou non viraux, afin d'éviter l'expression de transgènes dans les tissus sains normaux.

Une livraison locale du transgène est nécessaire comme preuve de principe, mais l'administration systémique est cliniquement bénéfique car elle permet l'administration du véhicule aux métastases et à certaines des tumeurs primaires, ce qui nécessite des procédures invasives pour l'accès local.

En effet, le développement de vecteurs systémiques efficaces assurerait la sécurité, seuls les tissus souhaités étant ciblés. Les principaux défis des essais cliniques de thérapie génique sont le ciblage vectoriel et le coût élevé de la production de vecteurs.

Par conséquent, le développement de vecteurs ciblés, qui médient l'expression efficace et à long terme du gène thérapeutique dans les tissus tumoraux après administration systémique, devrait fournir une avancée majeure dans la thérapie génique du cancer. À ce jour, deux approches principales ont été utilisées pour le ciblage des tumeurs :

- (i) Le ciblage transcriptionnel, qui utilise des promoteurs qui ne sont actifs que dans les tumeurs cibles,
- (ii) Le ciblage par ligand de vecteurs vers des récepteurs spécifiques exprimés dans le tissu tumoral (**Hajitou, A et al 2010**).

Chacune de ces approches a été tentée individuellement, par de nombreuses études, et a montré des résultats prometteurs pour l'administration de vecteurs et l'expression transgénique dans des modèles tumoraux précliniques.

### **3.1. Le Ciblage transcriptionnel**

Le ciblage sélectif et la destruction des cellules tumorales est un objectif majeur de la thérapie génique actuelle du cancer. Placer un transgène sous l'influence d'un promoteur spécifique au type cellulaire augmente les chances de son expression dans cette cellule particulière. (**Sadeghi, H et al 2005**). Habituellement, ces promoteurs sont fortement exprimés dans certains tissus (tumeur maligne) et restent à un faible niveau dans les tissus normaux, ce qui peut réduire ou même éliminer les effets secondaires toxiques potentiels du gène thérapeutique dans ces tissus normaux.

L'utilisation de promoteurs, tels que le promoteur du cytomégalovirus (CMV) dans la thérapie génique basée sur des vecteurs adénoviraux (Ad), a été bien caractérisée pour son activité constitutive, à la fois in vitro et in vivo. Cependant, le promoteur lui-même ne fait pas de discrimination significative entre les types de cellules, mais s'exprime à des niveaux élevés dans une gamme de tissus de mammifères (**Cheng, L et al 1993**), ce qui est problématique dans la thérapie génique du cancer.

D'autre part, les promoteurs, qui sont actifs dans les cellules tumorales, n'ont été utilisés que pour la livraison ciblée de gènes aux tumeurs, afin de délivrer sélectivement l'expression transgénique au tissu tumoral. Le ciblage transcriptionnel a été rapporté pour la première fois par deux études en 1997. Rodriguez et coll. ont restreint l'expression du transgène dans les cellules de la prostate produisant de l'antigène prostatique spécifique (APS) en appliquant le promoteur de l'antigène spécifique de la prostate dans l'ADN de l'adénovirus pour stimuler

l'expression du transgène, qu'ils ont appelé « adénovirus compétent en réplication atténuée » (**Rodriguez, R et al 1997**). De plus, en utilisant le promoteur de l'albumine, la réplication du vecteur du virus de l'herpès simplex (HSV-1) a été limitée aux cellules hépatiques exprimant l'albumine (**Miyatake, S. et al 1997**)

#### **Promoteur spécifique aux tissus :**

Plusieurs promoteurs tissulaires spécifiques qui ciblent des tumeurs d'une seule origine ont été caractérisés et utilisés dans la thérapie génique du cancer. Par exemples le promoteur spécifique de l'ovaire pour cibler le cancer de l'ovaire (**Bao, R. et al 2002**), Le promoteur de la tyrosine kinase a été utilisé, in vitro et in vivo, pour cibler les mélanomes (**Fecker, L.F et al 2011**).

Le promoteur de l'antigène prostatique spécifique (PSA) a été utilisé pour cibler le cancer de la prostate. Le PSA est principalement exprimé dans les cellules de la prostate en raison de l'activation transcriptionnelle. Il a déjà été démontré que le promoteur du PSA exprime le gène suicidaire thymidine kinase (HSVtk) du virus de l'herpès simplex dans les cellules cancéreuses de la prostate et les tumeurs de la prostate positives au PSA respectivement, cependant aucune expression transgénique n'a été observée dans les cellules qui n'expriment pas le PSA (**Gotoh, A et al 1998**).

Bien que ces promoteurs se soient avérés efficaces pour délivrer l'expression du transgène dans les cellules tumorales, leur activité, à la fois dans les cellules normales et tumorales, est considérée comme un inconvénient majeur.

#### **Promoteur spécifique au tumeur :**

Les promoteurs spécifiques de la tumeur constituent un choix idéal pour la thérapie génique ciblée du cancer afin de diriger l'expression de gènes thérapeutiques, car il a été démontré qu'ils sont très actifs dans les cellules tumorales tout en ayant peu ou pas d'activité dans les cellules normales. Sur la base de leurs caractéristiques, les promoteurs spécifiques de la tumeur ont été subdivisés en quatre groupes (**Robson, T et al 2003**) : les promoteurs spécifiques du cancer, des promoteurs spécifiques d'un type de tumeur, des promoteurs liés à la vascularisation tumorale, et des promoteurs liés au microenvironnement tumoral.

## **4- L'application de l'IL-12 dans l'immunothérapie du cancer**

### **4.1- Progrès, essais cliniques et défis**

L'immunothérapie à base de cytokines peut être efficace dans le traitement de nombreuses tumeurs malignes. L'IL-12 peut être considérée comme un bon candidat pour les interventions basées sur l'immunothérapie, car elle potentialise les cellules NK cytotoxiques spécifiques à la

tumeur et les cellules T CD8 + qui sont largement responsables de la destruction des cellules tumorales. Cependant, l'administration systémique d'IL-12 est assez toxique ; par conséquent, des méthodes alternatives de délivrance d'IL-12 et d'activation des lymphocytes T par l'IL-12 sont nécessaires (**Wang, P et al 2017**). Dans cette mesure, un rapport récent de Nguyen et al. ont fourni des mises à jour complètes sur le développement et l'application d'une stratégie d'administration localisée pour l'immunothérapie à base d'IL-12 (**Nguyen, K.G et al 2020**). Wang et al. ont rapporté que la délivrance systémique via un adénovirus oncolytique codant pour l'IL-12 dépourvu du peptide de signalisation réduisait les effets secondaires toxiques et améliorait la survie dans des modèles murins de cancer du pancréas (**Wang, P et al 2017**). La délivrance d'IL-12 médiée par les nanoparticules a également amélioré l'activité cytotoxique contre les cellules de carcinome hépatocellulaire humain. La délivrance in vitro d'IL-12 médiée par des nanoparticules spécifiquement dans les lymphocytes T CD8+ naïfs a favorisé leur expansion et l'activation du phénotype effecteur (**Li, J et al 2020**). Plusieurs études ont montré que l'IL-12 favorise la survie et la différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs vers le phénotype effecteur. L'IL-12 agit comme un facteur anti-apoptotique pour les lymphocytes T CD8 + et a montré une activité antitumorale durable contre des modèles murins de mélanome (**Díaz-Montero, C.M et al 2008**). Ces résultats suggèrent que l'amorçage des lymphocytes T CD8+ naïfs avec l'IL-12 avant la thérapie cellulaire adoptive pourrait augmenter leur efficacité et leur activité antitumorale. Des études précliniques similaires ont rapporté que les cellules T génétiquement modifiées, qui exprimaient des niveaux élevés d'IL-12, étaient thérapeutiquement efficaces contre les tumeurs de mélanome murin B16 établies, même en l'absence d'un vaccin antitumoral et d'IL-2 (**Kerkar, S.P et al 2010**).

Bien que la survie des cellules modifiées par IL-12 soit faible par rapport aux cellules T endogènes, elles ont démontré une fonctionnalité améliorée, ont été détectées à une fréquence plus élevée dans le mélanome et ont maintenu l'activité des cellules T endogènes NK et CD8+. Dans des essais cliniques, il a été démontré que l'IL-12 avait une activité anticancéreuse contre le gliome humain (**Chiocca, E.A et al 2019**).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration d'IL-12 intra-tumorale améliore l'efficacité des thérapies cellulaires T adoptives. Une autre avancée récente dans la potentialisation de l'activité antitumorale basée sur les cellules T a été l'augmentation de la charge d'IL-12 dans les cellules CAR T. Dans une récente étude préclinique sur la souris, Kueberuwa et al. ont utilisé des cellules CAR T exprimant l'IL-12 et ont montré que les cellules CAR T modifiées étaient capables de guérir le lymphome à cellules B et d'améliorer le taux de survie à long terme (**Kueberuwa, G et al 2018**). Dans ce contexte, les cellules CAR T conçues

par IL-12 ont recruté des cellules immunitaires hôtes pour déclencher une réponse immunitaire antitumorale. De plus, les cellules CAR T productrices d'IL-12 dirigées contre les cellules cancéreuses de l'ovaire ont montré une prolifération et une sécrétion robustes d'IFN- $\gamma$ , ce qui a entraîné une augmentation de la survie dans un modèle murin (**Koneru, M. et al 2015**). Des études précliniques similaires dans un modèle de carcinome hépatocellulaire ont indiqué que les cellules CAR T exprimant l'IL-12 produisaient des niveaux élevés de cytokines effectrices, accompagnés d'une infiltration atténuée de cellules Treg et d'une lyse des cellules tumorales induite (**Liu, Y. et al 2019**).

En résumé, ces observations révèlent que l'expression inductible d'IL-12 améliore les fonctions antitumorales des cellules CAR T et pourrait fournir une stratégie de traitement prometteuse pour les patients atteints de cancer. Néanmoins, les cellules CAR T exprimant l'IL-12 ont entraîné une toxicité sévère et une augmentation des taux sériques d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  chez les souris atteintes de mélanome. (**Kunert, A. et al 2018**). De plus, les cellules CAR T surexprimant l'IL-12 peuvent entraîner un syndrome de libération de cytokines (SRC) et provoquer des réponses inflammatoires systémiques chez les patients traités avec des cellules CAR T (**Bonifant, C.L et al 2016**).

Hewitt et al. ont démontré que la thérapie intra-tumorale par l'ARNm de l'IL-12 (MEDI1191) était capable de stimuler la production d'IL-12 dans le milieu tumoral sans effets toxiques. La combinaison de cette approche avec l'anti-PD-L1 a renforcé l'immunité anti-tumorale en favorisant la différenciation des cellules IFN- $\gamma$  + Th1 (**Hewitt, S.L et al 2020**).

L'IL-12 peut également avoir un rôle bénéfique en synergie avec les traitements de chimiothérapie. Chez les patients atteints de cancers métastatiques HER2+, un traitement synergique de l'IL-12 avec une chimiothérapie, comme le trastuzumab, a stimulé l'activité des cellules NK (**Bekaii-Saab, T.S et al 2009**). Des approches synergiques similaires pourraient être utilisées avec la radiothérapie. Deplanque et al ont montré que la suppression immunitaire radio-induite dans les tumeurs bien établies pouvait être surmontée par une augmentation des réponses Th1 dépendantes de l'IL-12 dans des modèles murins de cancer du côlon (**Deplanque, G. et al 2017**).

#### **4.2- Thérapie génique comme solution pour améliorer l'application de l'IL-12 chez les patients cancéreux**

La thérapie génique a longtemps été considérée comme un traitement prometteur contre le cancer. Cependant, la thérapie génique du cancer est toujours confrontée au défi de cibler les vecteurs de délivrance de gènes spécifiquement sur les tumeurs lorsqu'elles sont administrées par des voies systémiques non invasives cliniquement acceptables (c'est-à-dire par voie

intraveineuse). Le virus de la bactérie, bactériophage (phage), représente une nouvelle génération de vecteurs prometteurs dans la délivrance systémique de gènes puisque leur ciblage peut être réalisé grâce à des ligands d'affichage de capsides de phage, qui leur permettent de se loger sur des récepteurs tumoraux spécifiques sans qu'il soit nécessaire d'éliminer tout tropisme eucaryote natif. Hajitou et al ont déjà signalé un vecteur bactériophage spécifique à une tumeur nommé virus/phage adéno-associé, ou AAVP, dans lequel l'expression génique se fait sous un génome de virus rAAV2 humain recombinant ciblé sur les tumeurs via une capsid de phage dirigée par un ligand. Cependant, la thérapie génique du cancer avec ce vecteur ciblé sur la tumeur a obtenu des résultats variables allant de la régression tumorale à l'absence d'effet dans les modèles précliniques expérimentaux et naturels. (**Effrosyni T et al 2016**).

Grace aux propriétés antitumorales de l'IL-12 et aux caractéristiques du vecteur AAVP. On peut délivrer le gène d'IL-12 spécifiquement aux tumeurs en évitant leur effet toxique en cas d'injection systémique directe.

## **5- Ciblage dirigé par des ligands**

Les progrès dans le ciblage vasculaire des tumeurs ont fourni une plate-forme pour cibler les agents de manière sûre, efficace et sélective dans les tissus tumorigènes. L'utilisation de dépistages *in vivo* par affichage de phages a contribué de manière significative à l'identification de tels récepteurs cibles dans l'endothélium tumoral affecté de modèles animaux. Comme l'angiogenèse est vitale pour la progression tumorale, le ciblage de ces molécules de récepteurs spécifiques des cellules endothéliales spécifiques et associées à la tumeur présente le potentiel d'un ciblage dirigé par ligand dans la thérapie génique du cancer (**Hajitou, A. et al 2006**).

Les vecteurs viraux peuvent être conçus pour afficher des peptides à leur surface afin de cibler des types spécifiques de cellules tumorales porteuses de récepteurs. Cette méthode de ciblage garantit que le vecteur n'infecte que les cellules portant le récepteur, tout en laissant intactes les cellules qui n'ont pas le récepteur.

Les cellules vasculaires sont facilement accessibles par la circulation systémique du vecteur, par conséquent, le ciblage et la destruction du système vasculaire tumoral ont été un grand intérêt (**Hajitou, A. et al 2006**). Les néovascularisations qui soutiennent la croissance tumorale expriment différents marqueurs sur leur endothélium par rapport aux marqueurs quiescents normaux, tels que  $\alpha\beta3$ -intégrin (molécule d'adhésion). De plus, plusieurs tissus tumorigènes expriment ces intégrines, tels que le glioblastome (GBM), le mélanome, etc. L'intégrine  $\alpha\beta3$  est une cible thérapeutique prometteuse en raison de son expression limitée dans les tissus sains et de sa surexpression importante dans le cancer. Le peptide RGD4C,

dérivé du virus de la fièvre aphteuse est hautement sélectif pour  $\alpha\beta_3$ , et peut être utilisé en immunothérapie pour cibler les cellules tumorales exprimant  $\alpha\beta_3$  (Tsafa E et al, 2020).

## **6- Thérapie génique du cancer guidée par Virus Adéno-Associé/Phage AAVP**

### **6.1- Description et définition du Virus Adéno-Associé/Phage AAVP**

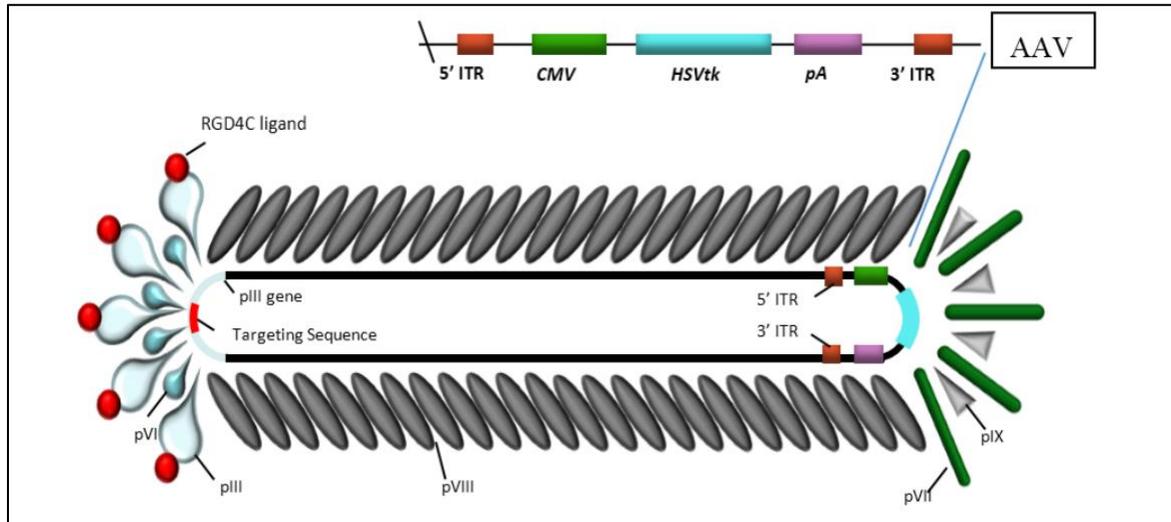
Les bactériophages, les virus qui n'infectent que les bactéries, présentent une stratégie alternative et plus sûre pour la délivrance systémique ciblée de transgènes, car ils n'ont pas de tropisme intrinsèque pour les cellules de mammifères, mais peuvent médier une expression génique modeste après manipulation génétique.

La production de bactériophages est rentable et peut être complétée à des titres élevés. De plus, les bactériophages peuvent être modifiés pour délivrer des gènes aux cellules de mammifères. De plus, les bactériophages ont été utilisés pour l'antibiothérapie pendant l'ère pré-antibiotique et ont été administrés en toute sécurité même chez les enfants après une administration systémique. En 2006, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a approuvé l'utilisation de certaines préparations de bactériophages pour les produits de viande et de volaille prêts à consommer (RTE) en tant qu'additifs alimentaires antibactériens (Lang, L.H. et al 2006).

Plus important encore, contrairement aux virus des eucaryotes, les bactériophages ne nécessitent pas de modification supplémentaire de leur capsid car les peptides de ciblage sont, en fait, sélectionnés et isolés directement pour cibler des récepteurs de surface cellulaire spécifiques après criblage d'une bibliothèque de peptides de présentation de phages. Cependant, ils ont été, dans le passé, considérés comme de mauvais véhicules de livraison de gènes car ils ont évolué pour infecter uniquement les bactéries et n'ont pas de stratégies optimisées pour exprimer efficacement les transgènes lors de leur entrée dans les cellules eucaryotes (Hajitou, A. et al 2010).

Afin de surmonter ces limitations, Hajitou et al en 2006 ont rapporté une nouvelle génération de vecteur viral hybride procaryote-eucaryote entre l'AAV eucaryote et le bactériophage filamenteux M13, alors nommé AAVP (AAV/phage), tous deux contenant un génome d'ADN simple brin (Figure 9). Ce vecteur exprime trois à cinq copies du ligand cyclique RGD4C sur la protéine d'enveloppe mineure du phage pIII permettant un ciblage systémique et spécifique du récepteur de l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , qui sont exprimés principalement sur

le système vasculaire tumoral et les cellules tumorales, et sont absents ou exprimés à des niveaux faibles dans l'endothélium et les tissus normaux (figure 18) (**Hajitou, A. et al. 2007**).



**Figure 18.** Structure du vecteur hybride AAV/phage (AAVP) développé par **Hajitou et al.2006**.

La particule contient un génome constitué d'une cassette transgène CMV flanquée de répétitions terminales inversées, 3' ITR et 5' ITR du AAV-2 et le génome du bactériophage filamenteux M13. La capside externe appartient au phage M13 et manque donc de tropisme pour les cellules de mammifères. La capside contient une protéine d'enveloppe majeure pVIII et quatre protéines d'enveloppe mineures pIII, pVI d'un côté et pVII pIX de l'autre. Le ligand de liaison à l'intégrine  $\alpha_v$ , RGD4C, est exprimé sur la protéine d'enveloppe mineure pIII de l'AAVP afin de permettre un ciblage dirigé par le ligand du système vasculaire tumoral et des cellules tumorales (**Hajitou et al. 2006**).

## 6.2- La contribution du Virus adéno-associé/Phage dans l'immunothérapie

Depuis son développement, le vecteur a fait l'objet d'investigations dans des modèles précliniques. Le National Cancer Institute of the USA (NCI) a utilisé les propriétés de ciblage des ligands du RGD4C-AAVP pour délivrer le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) au système vasculaire angiogénique des xéno greffes de mélanome humain chez la souris (**Tandle, A. et al 2009**). Dans cette administration systémique de la particule de phage, l'expression du TNF- $\alpha$  s'est révélée être spécifiquement localisée dans les tumeurs, entraînant une apoptose dans les vaisseaux sanguins tumoraux et une inhibition significative de la croissance tumorale, tout en restant pratiquement indétectable dans tous les autres tissus, notamment le foie et rate. Cependant, les particules RGD4C-AAVP, qui ont été trouvées dans ces deux derniers organes

vitaux, n'avaient pas leurs transgènes exprimés en eux. L'efficacité du RGD4C-AAVP ciblé exprimant le TNF- $\alpha$  a été évaluée chez des chiens domestiques atteints de sarcome des tissus mous (**Paoloni, M.C. et al 2009**). Des doses intraveineuses uniques et multiples du vecteur RGD4C-AAVP à ciblage vasculaire sont avérées spécifiques de la tumeur. Des administrations répétées de vecteurs ont entraîné une élimination complète du cancer chez quelques chiens et une stabilité chez d'autres, malgré la présence d'une réponse immunitaire élevée contre les particules virales du phage. Bien que les particules à base de phage soient connues pour être immunogènes, des administrations répétées chez des chiens domestiques et des souris immunocompétentes ont entraîné une thérapie antitumorale efficace (**Hajitou, A. et al 2007 et Paoloni, M.C. et al 2009**). Les propriétés de sélectivité et de sécurité du RGD4C/AAVP ont fait de ce nouveau vecteur hybride un outil prometteur qui présente un grand potentiel dans la thérapie génique systémique du cancer.

Les vecteurs dérivés de phages tel que l'AAVP continuent à posséder un défaut fondamental ; en effet, la présence d'une partie du génome du bactériophage ou souvent d'une séquence génomique complète du phage dicte la taille finale de la particule de vecteur. Étant donné que les phages filamenteux ont une longueur de particule dépendante du génome, une capsidie inutilement longue entraîne des limitations de la réplication et de l'emballage, de la capacité de clonage et de la sensibilité à la clairance par le système réticulo-endothélial. Ces facteurs contribuent de manière significative à la mauvaise absorption et à l'induction de l'expression génique, Des études antérieures sur l'AAVP ont exploré un certain nombre de stratégies pour améliorer l'efficacité de transduction relativement faible par rapport aux virus de mammifères conventionnels (**Kia et al , 2013 ; Przystal et al , 2013 ; Yata et al , 2015**).

## IV. Hypothèse

L'immunothérapie guidée par les vecteurs dérivés de phages réside ainsi l'hypothèse suivante :

- Si l'organisme a déjà repéré le cancer mais n'est pas capable de le détruire en totalité, le traitement devra alors stimuler les défenses immunitaires de l'organisme de façon à se défendre de manière plus vigoureuse et plus suffisante contre les tumeurs.
- La délivrance locale de l'IL-12 par vecteurs dérivés de phages va éviter les effets toxiques liés à la pléiotropie de cette cytokine, et va améliorer l'immunité antitumorale.

- L'expression de l'IL-12 au sein des cellules tumorales va permettre l'activation du système immunitaire afin d'éliminer la tumeur.

## **V. Objectifs**

- 1- Conception et production d'un vecteur avec une spécificité et une efficacité importante capable de maintenir l'expression suffisante d'une cassette contenant le gène d'IL-12.
- 2- Induire une réaction immunitaire ciblée sur les tumeurs sans endommager les tissus sains basée sur les propriétés antitumorales de l'IL-12.

# Partie pratique

## I. Matériel et méthodes

### 1- Conception et construction de particules de phage/AAV transmorphiques TPA

Les particules de phage/AAV transmorphiques TPA ont été conçues et construites à l'aide du plasmide rAAV2-GFP à partir d'un kit de production d'AAV à l'échelle du laboratoire disponible dans le commerce (CellBioLabs, États-Unis) et d'un phage auxiliaire modifié M13KO7 basé sur le phage auxiliaire filamenteux M13 (NEB, Royaume-Uni).

Le plasmide rAAV2 a été utilisé comme base pour la construction de tous les plasmides TPA en remplaçant la séquence d'ADN GFP par le gène d'intérêt, pour notre étude c'est le gène de l'IL12.

Pour emballer le transgène rAAV.IL12 (TPA.IL12) dans des particules de TPA, nous avons conçu M13KO7.RGD4C.

#### 1.1- Préparation du phage auxiliaire M13KO7.RGD4C

- M13KO7 portant la double mutation d'insertion cyclique RGD4C sur le gène de la protéine d'enveloppe mineure pIII à l'aide d'amorces d'ADN, est amplifié par Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, UK) selon les recommandations du fabricant.
- L'amplicon de RGD4C.M13KO7 a ensuite été auto-ligaturé à l'aide d'une ligase rapide (NEB, Royaume-Uni).
- L'amplicon de RGD4C.M13KO7 auto-ligaturé est transformé en E.coli Mix&Go Competent TG1 chimiquement compétente (Zymo Research, USA) selon le protocole recommandé par le fabricant.
- Les cellules transformées ont été étalées sur une gélose à l'extrait de levure Tryptone TYE additionnée de 50 µg/ml de kanamycine et incubées pendant 18 heures à 37 °C.
- Les colonies ont été prélevées et cultivées dans un milieu liquide 2xYT additionné de 50 µg/ml de kanamycine, sous agitation à 200 tr/min pendant une nuit pendant 18

heure supplémentaire. L'excroissance bactérienne a ensuite été extraite pour l'ADN à l'aide du kit de minipréparation de plasmide (QIAGEN, Royaume-Uni),

- Ensuite l'ADN extrait est chargé sur électrophorèse sur gel pour confirmer la taille correcte du plasmide et envoyé pour séquençage (Eurofins, Allemagne) du gène pIII afin d'identifier les clones positifs.

Les clones positifs M13KO7 porteurs de mutations sont appelés RGD4C.M13KO7.

- Pour créer des stocks de M13KO7 et de RGD4C.M13KO7, des clones bactériens portant le génome du phage auxiliaire ont été cultivés dans 500 mL de 2xYT additionné de 50 µg/mL de kanamycine, puis incubés sous agitation à 200 tpm à 37 °C pendant une nuit supplémentaire pendant 18 heures. La culture a ensuite été soumise à une purification de phages.

## **1.2- Préparation de le plasmides TPA.IL12**

Pour construire le plasmides TPA.IL12, le clonage moléculaire a été réalisé à l'aide de digestions par des enzymes de restriction (NEB, Royaume-Uni), de la réaction en chaîne par polymérase Q5 High-Fidelity (NEB, Royaume-Uni) et du kit Quick Ligation™ (NEB, Royaume-Uni) :

- L'IL12 flanquée des sites AscI et Sall a été amplifiée à partir de UNO1-mIL12 (Invivogen, France).
- La séquence IL12 a ensuite été ligaturée au squelette TPA et transformée dans des bactéries compétentes DH5α. Les constructions finales ont été confirmées par des digestions par des enzymes de restriction et un séquençage d'ADN.
- Les constructions correctes ont ensuite été transformées dans Mix&Go Competent TG1 E. coli (Zymo Research, USA) pour produire des particules de TPA.

## **1.3- Production de particules de TPA**

- Pour produire des particules de TPA, nous avons transformé Mix&Go Competent TG1 E. coli (Zymo Research, USA) en utilisant le plasmide TPA.IL12. Les clones ont été criblés à l'aide d'un kit de minipréparation de plasmide (Qiagen, Royaume-Uni) et soumis à une électrophorèse sur gel d'ADN pour confirmer la taille correcte.

- Les clones positifs ont été cultivés dans 50 ml de milieu liquide 2xYT (agité à 200 tr/min, 37°C) additionné de 100 µg/ml d'ampicilline jusqu'à la phase logarithmique ( $DO_{600}=0,4-0,6$ ) et surinfectés en ajoutant  $1 \times 10^{12}$  UT de RGD4C.M13KO7, mélangés par tourbillonnement, et incubé (37°C) pendant 20 minutes. La culture infectée a été ajoutée à 450 ml de milieu 2xYT frais additionnée de 100 µg/ml d'ampicilline et de 50 µg/ml de kanamycine, et incubée pendant une nuit, pendant 18 à 20 heures, sous agitation à 200 tr/min, 37 °C.
- La même chose est effectuée en utilisant la surinfection par M13KO7 considérée comme témoin.

#### **1.4- Purification des particules de TPA**

- La culture 500 ml d'une nuit, a été immédiatement centrifugée à 3000-6000 g pendant 15-30 minutes à 4°C, le surnageant a été collecté et le culot bactérien jeté. Une solution de PEG/NaCl glacée (polyéthylène glycol 8000 à 20 %, NaCl à 2,5 M dans de l'eau déminéralisée) a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 30 % et tourbillonnée pour un mélange doux.
- Le mélange surnageant/PEG/NaCl était laissé à 4°C pendant une nuit, puis centrifugé à 10000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot remis en suspension dans 10 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS).
- Ensuite, la solution a été à nouveau précipitée avec une solution de PEG/NaCl à 4°C pendant une autre nuit.
- Après centrifugation, le surnageant a été jeté et le culot de phage remis en suspension dans 1 ml de PBS. Un autre cycle de centrifugation à 10 000 g a été effectué pendant 10 minutes pour éliminer les débris bactériens.
- Le surnageant de phage brut a été recueilli puis filtré à travers un filtre à membrane en PVDF de 0,45 µm pour éliminer les débris bactériens fins.
- Les particules de RGD4C.TPA.IL12 sont stockées de manière stable à 4°C ; cependant, nous surveillons régulièrement leur titre après un long stockage. À ce jour, l'équipe de Monsieur Hajitou ont conservé des TPA à 4°C pendant 2 ans sans aucune baisse significative de leur titre.

#### **1.5- Titrage des particules de TPA**

Les particules de RGD4C.TPA.IL12 ont été quantifiées chez des hôtes procaryotes.

- Des dilutions en série de particules de TPA ont été réalisées dans du PBS et utilisées pour infecter TG1 E.coli cultivées en phase logarithmique dans du milieu liquide

2xYT, qui ont ensuite été incubées à 37°C. Après 20 minutes d'incubation à 37°C dans un bain-marie, le mélange particules/bactéries a été bien mélangé à nouveau, et a été étalé sur un milieu gélosé solide avec des antibiotiques sélectifs.

- Les particules de TPA contiennent un gène résistant à l'ampicilline, c'est pourquoi la TYE top agar avec 100 µg/ml d'ampicilline a été utilisée. Alors que la particule de phage auxiliaire contient un gène résistant à la kanamycine, la gélose supérieure TYE avec 50 µg/ml de kanamycine a été utilisée.
- Les bactéries ont été étalées sur TYE top agar en présence d'ampicilline pour déterminer la concentration de particules de TPA et de kanamycine pour déterminer la concentration de phage auxiliaire présent dans l'échantillon viral par comptage des colonies.
- Toutes les plaques de gélose ont été incubées à 37°C pendant 18 à 20 heures jusqu'à ce que des colonies soient visibles. Les TPA sont exprimés en unités de transduction bactérienne UT/ul.

## **2- Culture de cellules**

Les cellules de carcinome du côlon de souris CT26.CL25 et de mélanome de souris B16.F10 ont été achetées auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection).

- Les cellules CT26.CL25 a été cultivé dans du milieu RPMI1640 additionné d'HEPES 10 mM, de pyruvate de sodium 1 mM, d'acides aminés non essentiels 0,1 mM et de FBS à 10 %.
- Les cellules B16.F10 ont été cultivées dans du milieu d'aigle modifié de Dulbecco (DMEM) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (FBS) et de 1 % de pénicilline et de streptomycine.

Toutes les cellules utilisées dans cette étude ont été soit authentifiées par le fournisseur ATCC soit par des collaborateurs qui les ont fournies. Dès réception de ces lignées cellulaires, elles sont d'abord testées et débarrassées de la contamination par les mycoplasmes. Les cellules en culture tissulaire subissent des tests mensuels réguliers de mycoplasmes (Lonza, Royaume-Uni).

### **3- Transduction in vitro de cellules adhérentes et de sphères tumorales à l'aide de particules de TPA**

- Les cellules adhérentes ont étéensemencées dans des plaques à puits de culture tissulaire de tailles préférées pour atteindre une confluence de 70 à 80 % 48 heures après l'ensemencement.
- Le jour de la transduction, le nombre moyen de cellules par puits/boîte de culture a été déterminé et utilisé pour calculer la quantité de particules de TPA à ajouter aux cellules.
- Le mélange de transduction est ensuite préparé en diluant la quantité appropriée de la solution mère de particules dans un milieu sans sérum, puis en mélangeant soigneusement. Le volume recommandé de mélange de transduction utilisé par puits/plat est le volume minimum requis pour couvrir complètement la monocouche cellulaire.
- Pour transduire les cellules, le milieu a été jeté et le mélange de transduction a été ajouté aux cellules pendant 6 à 12 heures à 37 °C 5 % de CO<sub>2</sub> avant supplémentation avec un volume égal de milieu complet. Après 24 heures, le milieu entier a été jeté et remplacé par du milieu frais. Les cellules transduites ont été maintenues en culture jusqu'à l'analyse.

### **4- Quantification de l'expression sécrétée de la luciférase dans le milieu de culture**

- À des moments précis après la transduction avec TPA.Luc portant la séquence d'ADN de Luc, 10 µL de milieu de culture ont été prélevés dans les puits et transférés dans des plaques opaques à 96 micropuits. L'activité luciférase a été quantifiée à l'aide de QUANTI-Luc, un substrat de luciférase a été préparé selon le protocole du fabricant (Invivogen, France) et ajouté à la plaque de micropuits. L'activité de la luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre GloMax Discover Microplate (Promega, Royaume-Uni). Pour ces expériences, le milieu de culture n'a été changé à aucun moment.

## **5- Test immuno-enzymatique (ELISA)**

- La production d'IL-12 dans le surnageant ou les lysats cellulaires après la transduction a été quantifiée à l'aide d'un ensemble ELISA MAX™ Deluxe d'IL12 de souris (p70) (Biolegend, Royaume-Uni). Les dosages ont été effectués selon les instructions du fabricant.

## **6- Élimination des endotoxines**

- Les endotoxines contaminant les préparations de TPA ont été éliminées à l'aide de colonnes de centrifugation d'élimination d'endotoxines à haute capacité Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Royaume-Uni). En bref, 2 ml de solution de particules de phage ont été chargés dans les colonnes équilibrées et incubés pendant une nuit avec un mélange doux de bout en bout à 4°C. La solution de phage a été éluée par centrifugation à 500 g pendant 1 minute. Le niveau d'endotoxine a ensuite été mesuré à l'aide de flacons de test unique PYROGENT™ Plus de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Lonza, Royaume-Uni).

## **7- Immunothérapie chez les souris porteuses de tumeurs**

- Pour établir des modèles de souris porteuses de tumeurs pour l'immunothérapie, les cellules tumorales ont d'abord été marquées avec le gène rapporteur Luc en utilisant un vecteur lentiviral Lenti-GFP-Luc (System Biosciences, Royaume-Uni) pour générer les CT26.CL25-Luc.
- Ensuite CT26.CL25-Luc ont été implantés par voie sous-cutanée chez des souris ( $1 \times 10^6$  cellules/souris). Le BLI de Luc a donc été utilisé comme un moyen simple de détecter les tumeurs, de surveiller la croissance et la viabilité des tumeurs et d'évaluer la réponse tumorale au traitement.
- Des souris porteuses de tumeurs ont reçu par voie intraveineuse par la veine caudale des particules de TPA ciblées portant des transgènes de l'IL12 à une dose de  $5 \times 10^{10}$  UT/souris ou autrement indiqué dans le manuscrit. Pour surveiller l'expression de la luciférase, les souris ont été anesthésiées et administrées avec 100 mg/kg de D-luciférine (Gold Biotechnology, États-Unis), puis imagées à l'aide du système d'imagerie in vivo (IVIS 100 ; Caliper Life Sciences/ Perkin Elmer, Royaume-Uni). La même étape est réalisée en utilisant des particules de TPA non ciblées portant des transgènes de l'IL12 pour le témoignage.

- Une région d'intérêt a été définie manuellement sur les tumeurs pour mesurer les intensités de signal enregistrées en nombre total de photons par seconde par cm<sup>2</sup> (p/sec/cm<sup>2</sup>/sr) (**Hajitou et al, 2007 ; Hajitou et al., 2006**).
- La croissance tumorale a été évaluée en mesurant l'intensité du signal de la luciférase tumorale dans le temps. A la fin de l'expérience, la tumeur et les tissus sains ont été récoltés. Des sérums de souris ont également été collectés pour évaluer toute toxicité systémique par mesure quantitative de la LDH (lactate déshydrogénase) à l'aide du test de cytotoxicité colorimétrique CytoTox 96® (Promega, Royaume-Uni).
- Des expériences impliquant des souris vivantes ont été réalisées conformément aux directives institutionnelles et du ministère de l'Intérieur, et sous un numéro de licence de projet délivré par le ministère de l'Intérieur, PPL 70/7035. La licence du projet a d'abord été examinée et approuvée par l'Organe d'examen du bien-être animal et de l'éthique (comité AWERB) de l'Imperial College de Londres, avant son examen final et son approbation par le Home Office du Royaume-Uni.
- Des souris C57BL/6 ou BALB/c immunocompétentes, adultes de 5 à 7 semaines, chez Envigo, Royaume-Uni.

## **8- Analyses statistiques**

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel de statistiques IBM SPSS version 25. Les valeurs p ont été générées soit par un test t indépendant, soit par une ANOVA unidirectionnelle avec le test post hoc de différence honnêtement significative (HSD) de Tukey, soit par une ANOVA bidirectionnelle. Les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont également été utilisés comme test non paramétrique. Les courbes de survie des animaux ont été générées à l'aide de la méthode de Kaplan – Meier (fractions de survie de Kaplan – Meier). Les valeurs de p ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$  et représentées comme suit : \* $p < 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Les expériences in vitro ont été conçues pour garantir un niveau de signification de 5 % et une puissance minimale de 80 %. Les expériences ont été réalisées en triple et répétées, au moins deux fois, augmentant le nombre total d'échantillons, ce qui est suffisant pour une puissance statistique supérieure à 80 %.

Pour l'expérimentation animale, nous avons appliqué les principes des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). Cependant, les expériences ont été reproduites, ce qui a augmenté le nombre total d'animaux et par la suite la puissance statistique. Nous avons

également tenu compte du fait que certains animaux sont éliminés avant le point final. En effet, les animaux présentant une nécrose/ulcération tumorale (caractérisée par une perte de tissu) sont abattus et exclus conformément à notre licence de projet délivrée par le Home Office. De plus, la mise en aveugle a été appliquée tout au long des études animales. Lors de la détection de la tumeur, les souris porteuses de tumeur ont été assignées au hasard à des groupes. Ensuite, l'imagerie des souris porteuses de tumeurs a été réalisée, cage par cage, en aveugle et en appliquant des paramètres similaires pour toutes les cages.

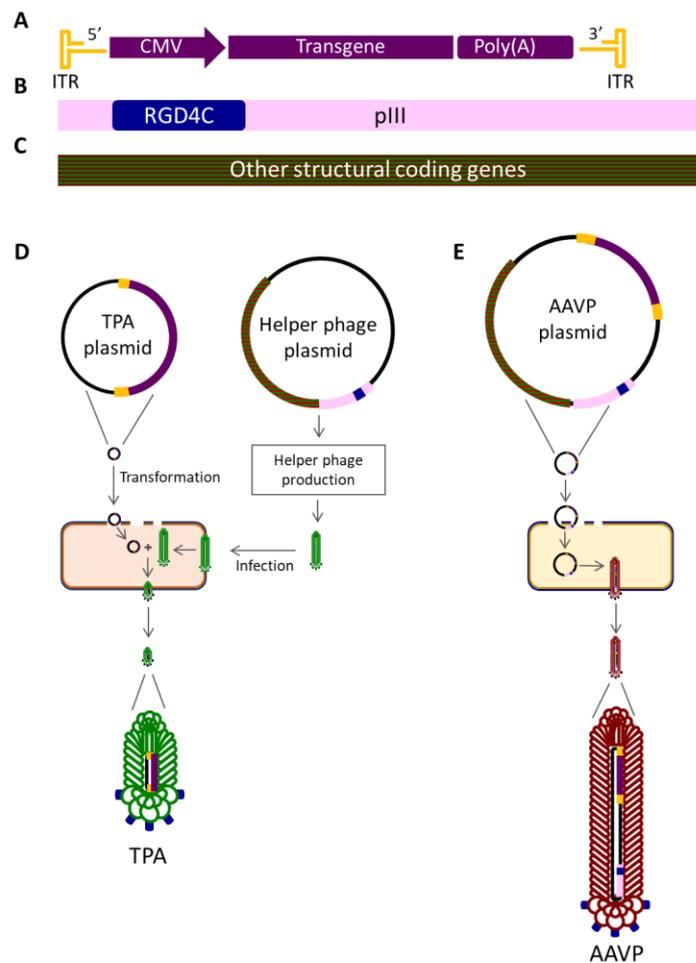
## **II. Résultats**

### **1- Conception et production de particules transmorphiques**

La production et la conception des particules de phage/AAV transmorphiques (TPA) ciblées sur la tumeur nécessite un phage auxiliaire filamenteux M13KO7 et un plasmide TPA constitué à partir de l'ADN du sérotype 2 du rAAV (AAV.CMV.GFP), qui présente à la fois une origine de réplication pUC à nombre de copies élevé, une origine de réplication de phage F1 et une cassette d'expression transgénique d'IL12 flanquée de répétitions terminales inversées, 3' ITR et 5' ITR (figures 19A).

Nous avons induit une mutation d'insertion double cyclique RGD4C dans le gène de la protéine pIII du phage auxiliaire filamenteux M13KO7 (Figure 19B et 19C), appelée RGD4C.M13KO7, qui contient une origine de réplication p15A à numéro de copie moyen.

En présence de RGD4C.M13KO7, le plasmide TPA sera empaqueté dans les bactéries par la capsid du bactériophage ciblée sur la tumeur (Figure 19D).



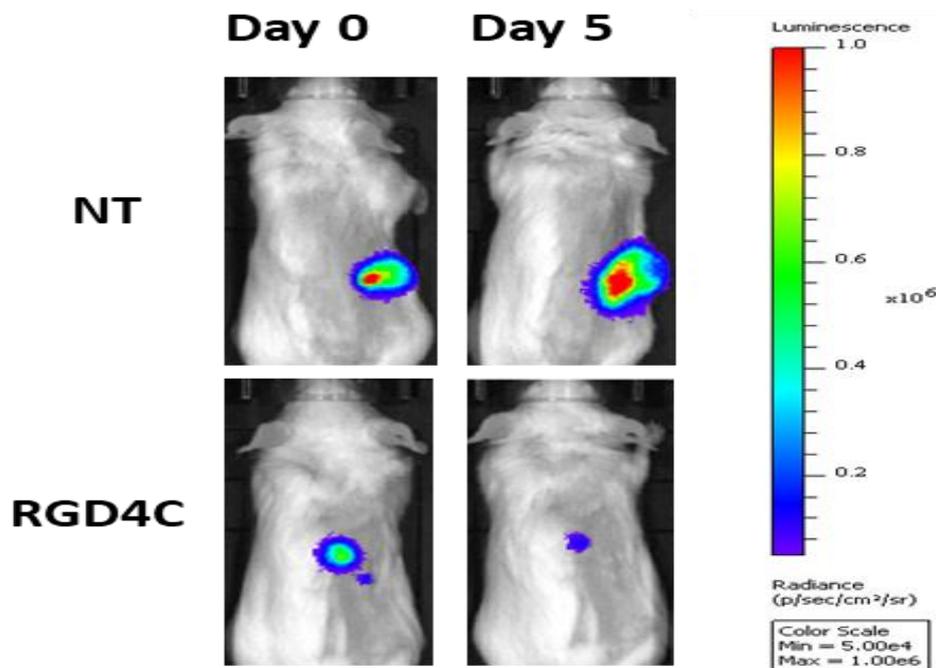
**Figure 19.** Construction du TPA

La production de particules de TPA nécessite deux éléments clés : (A) un plasmide contenant une cassette de transgène de mammifère flanquée d'ITR AAV-2 (plasmide TPA) et (B) des protéines d'enveloppe dérivées de bactériophages ciblées sur la tumeur contenant la mutation d'insertion du peptide RGD4C sur le gène pIII de la protéine d'enveloppe du phage filamenteux M13KO7, RGD4C.M13KO7, dont le génome contient d'autres gènes de structure requis pour les autres sous-unités protéiques générales pour l'assemblage du phage (C). (D) Pour encapsider la cassette d'ADN AAV à l'aide des protéines de capsid du bactériophage, le plasmide AAV est transformé en hôtes E.coli compétents et ensuite infecté avec le phage auxiliaire RGD4C.M13KO7. La particule résultante a les caractéristiques externes d'un bactériophage ciblé sur une tumeur mais ne contient que la cassette de transgène d'ADN d'AAV codant pour un gène d'intérêt. (E) Le génome du vecteur AAVP contient une cassette de transgène insérée d'AAV-2 et une insertion du ligand RGD4C sur les protéines d'enveloppe mineures pIII du vecteur de présentation de phage fUSE5. Le génome d'AAVP contient donc à la fois des gènes de structure de phage et une cassette de transgène d'AAV.

## 2- Immunothérapie tumorale par particules transmorphiques porteuses d'IL12

Pour valider davantage les effets antitumoraux observés chez des souris immunocompétentes, nous avons effectué une immunothérapie dans des tumeurs solides à l'aide d'IL12. Au cours des deux dernières décennies, l'IL12 est devenue l'une des cytokines les plus puissantes dans la médiation de l'activité antitumorale dans une variété de modèles précliniques (**Berraondo et al. 2018**). Pourtant, la majorité des essais cliniques impliquant l'IL12 n'ont pas montré de réponses antitumorales soutenues chez les patients cancéreux en raison du manque de sélectivité tumorale entraînant une toxicité systémique (**Nguyen et al, 2020**). Nous avons testé l'efficacité thérapeutique des particules transmorphiques codant pour l'IL12 chez des souris BALB/c immunocompétentes avec des tumeurs de carcinome du côlon de souris CT26.CL25 sous-cutanées établies marquées avec le gène Luc.

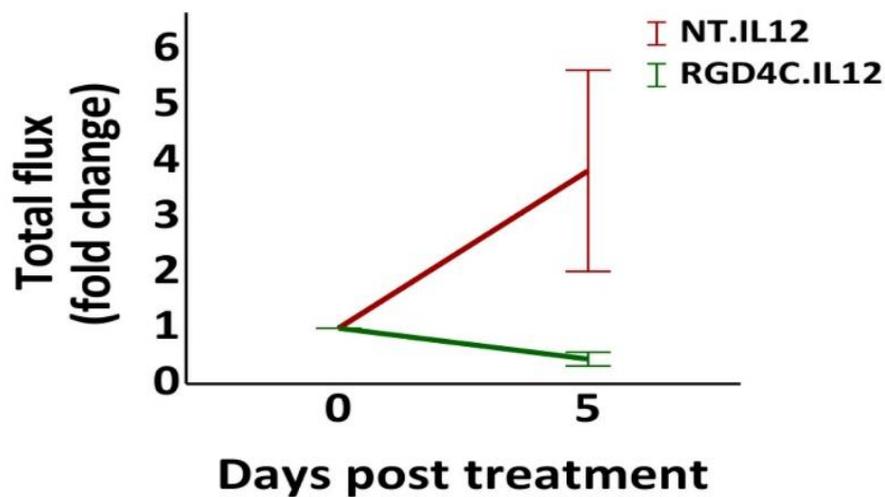
Des souris porteuses de tumeurs ont été traitées avec 3 doses de TPA.IL12, aux jours 0, 2 et 5 après le traitement. L'imagerie en bioluminescence in vivo (BLI) de Luciferase a montré que des administrations systémiques de RGD4C.TPA.IL12 ciblé inhibaient non seulement la croissance tumorale, mais entraînaient également une régression substantielle de la taille de la tumeur par rapport à l'initiation du traitement au jour 0 (Figure 20).



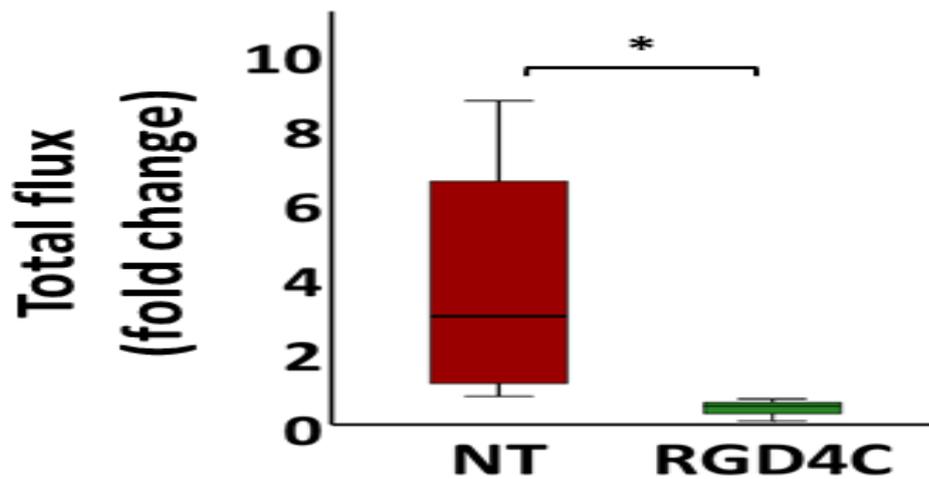
*Figure 20. Imagerie en bioluminescence in vivo (BLI) de Luciferase.*

Des particules de TPA codant pour IL12 ont été utilisées pour traiter des souris BALB/c immunocompétentes porteuses de tumeurs CT26.CL25 sous-cutanées marquées avec un gène rapporteur Luc. Souris porteuses de tumeurs représentatives au jour 5 après le traitement avec RGD4C.TPA ciblé. IL12 (RGD4C) et TPA non ciblé. IL12 (NT).

En revanche, les tumeurs ont continué à grossir chez les souris compte tenu des particules non ciblées. En outre, l'évaluation des signaux bioluminescents dans les tumeurs a montré une réduction significative de la viabilité tumorale de plus de 10 fois au jour 5 après le traitement à l'aide de particules ciblées RGD4C par rapport au groupe témoin recevant des particules non ciblées (Figure 21, Figure 22).

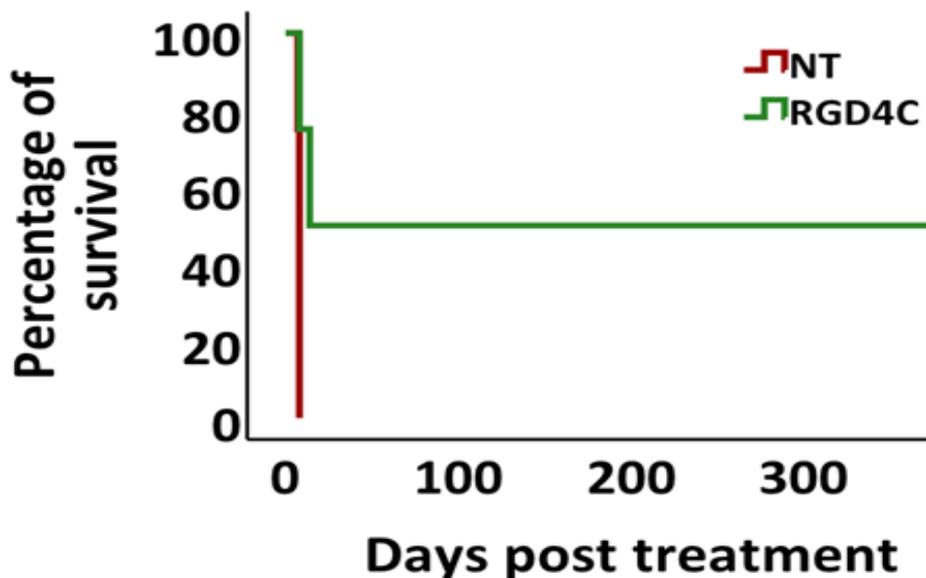


**Figure 21.** Graphique montrant la croissance tumorale après administration ciblée d'IL12. Des souris porteuses de tumeurs injectées avec des particules de TPA non ciblées (NT) ont été incluses comme témoins ( $n = 4$  souris par groupe).



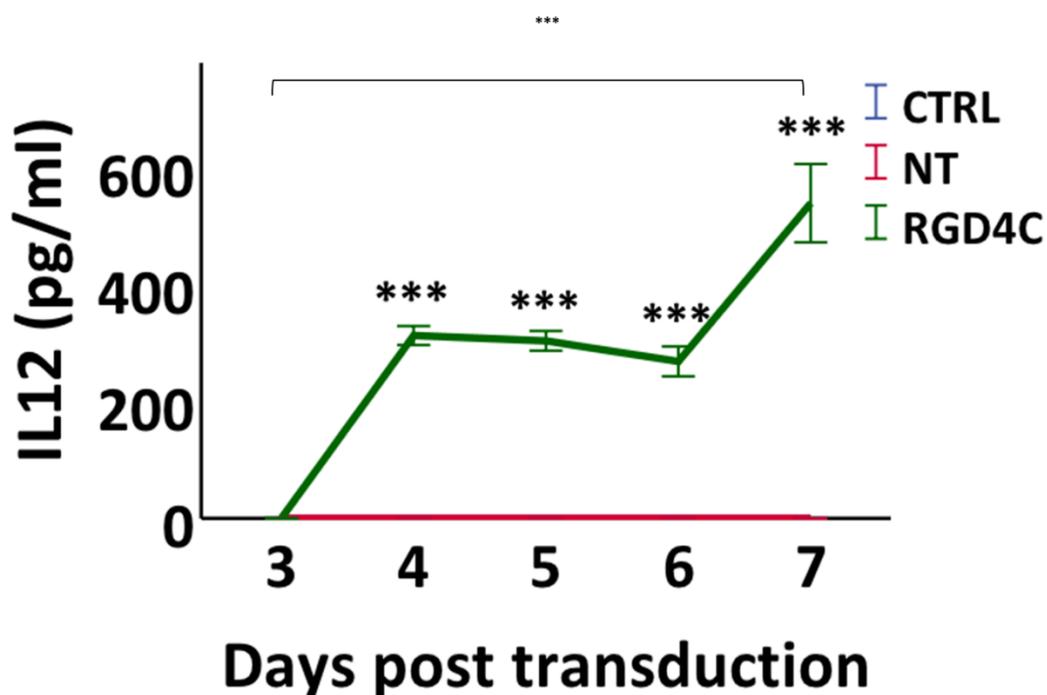
**Figure 22.** Analyse du changement de la croissance tumorale ( $n = 4$  souris) après immunothérapie à l'IL12.

Nous avons également évalué l'impact de l'efficacité thérapeutique sur la survie des souris atteintes de tumeurs CT26.CL25 et avons constaté que le traitement avec RGD4C.TPA.IL12 augmentait la survie des souris porteuses de tumeurs (Figure 23). Par exemple, alors qu'il n'y avait pas de survie animale au jour 8 après le traitement dans le groupe témoin non ciblé. Remarquablement, plus de 50 % des souris traitées avec le RGD4C.TPA.IL12 ciblé avaient survécu et étaient guéries à la suite d'une réponse complète au traitement et à l'élimination de la tumeur (figure 23).



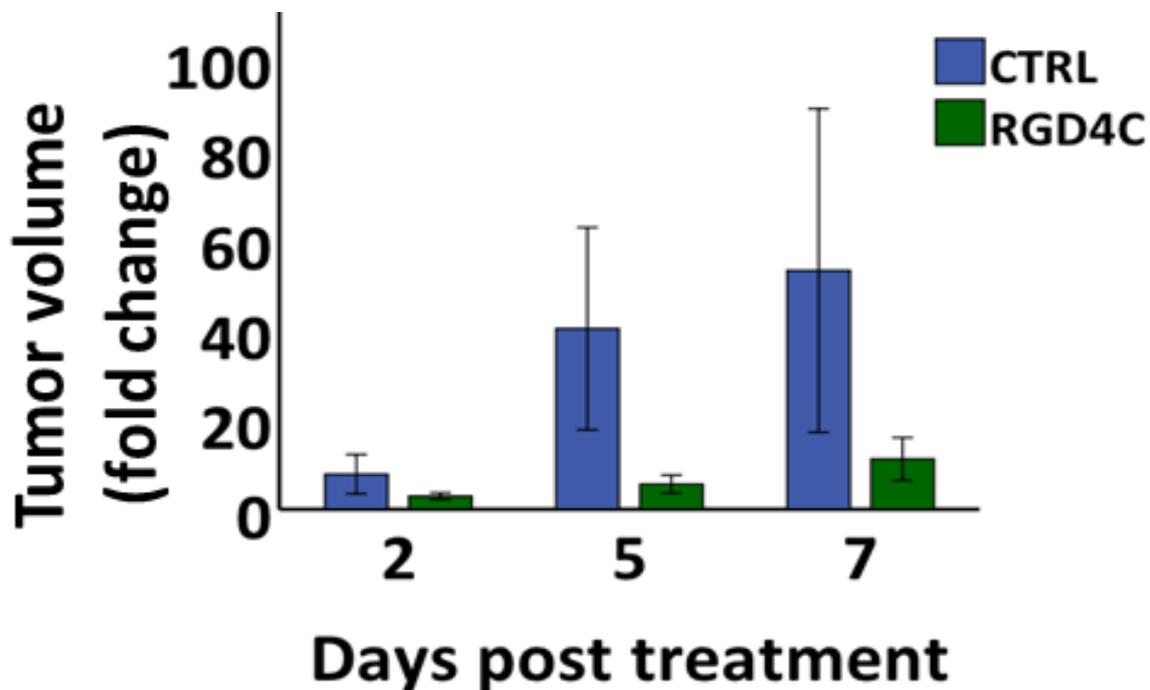
**Figure 23.** Courbes de Kaplan-Meier montrant le bénéfice de survie pour les souris porteuses de tumeurs ( $n = 4$ ) de deux groupes expérimentaux.

Pour exclure la possibilité d'une espèce ou d'une activité spécifique de tumeur attribuée à l'IL12, nous avons mené une enquête en utilisant le modèle de mélanome de souris B16.F10 qui établit un mélanome syngénique chez des souris C57BL/6. Les B16.F10 sont des modèles murins bien reconnus utilisés pour les tests précliniques d'approches immunothérapeutiques. Tout d'abord, pour confirmer que l'IL12 peut être délivrée et sécrétée efficacement à l'aide de particules transmorphiques, nous avons transduit des cellules B16.F10 in vitro à l'aide de RGD4C.TPA.IL12 ou de NT.TPA.IL12 non ciblé. Les cellules traitées avec des particules ciblées RGD4C ont exprimé et libéré de l'IL12 dans le milieu de culture à partir du jour 4 et culminant au jour 7 après la transduction à 500 pg/Ml (figure 24). Le groupe non ciblé et le groupe témoin non traité n'ont montré aucune IL12 détectable dans le milieu de culture.



**Figure 24.** Quantification en série de l'IL12 dans des milieux de cellules B16.F10 traitées avec RGD4C.TPA.IL12 ou contrôles. Les données sont représentatives d'une expérience,  $n = 3$  répétitions biologiques. Les expériences ont été répétées trois fois. L'ANOVA unidirectionnelle avec le test HSD de Tukey a été utilisée pour l'analyse des données.

Ensuite, nous avons effectué une immunothérapie chez des souris C57BL/6 portant des tumeurs sous-cutanées B16.F10. Lors d'administrations intraveineuses répétées de RGD4C.TPA.IL12, aux jours 0, 2 et 5, (comme chez les souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26.CL25), nous avons observé une réduction du volume tumoral de 4 et 5 fois aux jours 5 et 7 post-traitement par rapport au groupe témoin (non traité), respectivement (figure 25).



*Figure 25. Immunothérapie RGD4C.TPA.IL12 des tumeurs B16.F10 sous-cutanées chez la souris C57BL/6 (n = 4).*

Ceci est important car de nombreuses études d'immunothérapie n'ont pas réussi à retarder la croissance de ces tumeurs très agressives. Ensemble des résultats in vivo des deux modèles immunocompétents indiquent que les particules transmorphiques peuvent être utilisées pour délivrer l'IL12 native pour une immunothérapie efficace contre les tumeurs solides.

### III. Discussion

L'immunothérapie a le potentiel de créer un impact énorme dans le traitement du cancer si elle est capable d'éviter les problèmes associés aux méthodes de délivrance et à la spécificité. Étant donné que les cytokines sont des molécules pléiotropes, la réalisation d'un contrôle spécifique de leur synthèse et de leur libération a été un défi insurmontable.

L'efficacité et l'innocuité de l'immunothérapie anticancéreuse peuvent être considérablement améliorées lorsqu'elles sont associées à une stratégie d'administration efficace. Les particules de TPA résultantes de l'emballage transmorphique de l'ADN du rAAV à l'aide d'une capsid de phage filamenteux ciblée sur la tumeur sont capables de cibler et de délivrer efficacement des gènes immunothérapeutiques aux cellules tumorales in vitro et in

vivo, tout en évitant les tissus sains. Ici, nous démontrons son potentiel de livraison systémique contrôlé et sûr des gènes thérapeutiques sur le site de la pathologie.

En utilisant la fraction de ciblage RGD4C sur la surface cellulaire qui se lie principalement à l'hétérodimère d'intégrine  $\alpha\beta_3$ , mais aussi dans une moindre mesure à  $\alpha\beta_5$  (**Przystal et al, 2019**), nous avons pu délivrer des gènes de cytokines à la tumeur sans aucune expression détectable dans les tissus/organes sains. Hajitou et al et leurs collaborateurs ont publié un grand nombre de travaux rapportant la sélectivité tumorale des vecteurs à base de RGD4C.Phage chez les souris, les rats et les chiens de compagnie (**Hajitou et al, 2006 ; Paoloni et al, 2009 ; Tandle et al, 2009 ; Przystal et al, 2013, 2019 ; Yuan et al, 2013**), sans délivrance de gènes détectée dans les tissus sains.

Un panel de cellules primaires humaines normales d'origines histologiques différentes n'exprime pas ou présente une très faible expression des  $\alpha\beta_3$  et  $\alpha\beta_5$  récepteurs d'intégrine de RGD4C (**Przystal et al, 2019**). Notamment, ce profil d'intégrine très faible ne s'est pas traduit par la délivrance de gènes à des cellules normales par des vecteurs dérivés de RGD4C.Phage. Enfin, le peptide RGD4C a été utilisé chez des patients cancéreux en immunothérapie pour cibler le récepteur de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  dans le cancer humain (**Reardon et al, 2008**).

En plus les particules de TPA sont plus susceptibles que d'autre vecteurs de délivrance de gènes par exemple l'AAVP (virus/phage adéno-associé : vecteur dérivé du phage M13) de diffuser dans l'espace extracellulaire, y compris la matrice extracellulaire et deviennent ainsi plus biodisponibles pour se lier à la surface cellulaire, ce qui entraîne un taux beaucoup plus élevé d'internalisation des particules, en particulier par l'endocytose médiée par la clathrine (**Stoneham et al, 2012 ; Yata et al, 2015**).

De plus, la délivrance de gènes de cytokines et la capacité d'induire une expression soutenue ne sont actuellement pas réalisables en immunothérapie grâce à l'utilisation de cytokines recombinantes. En utilisant des particules de TPA, nous sommes en mesure de surmonter la stabilité physique et la demi-vie circulante des cytokines puisque les particules de TPA emballées sont stables à température ambiante pendant des mois.

Dans notre étude, nous avons exploré l'utilisation de IL12 qui implique toute la destruction des tumeurs à médiation cellulaire et fournisse des résultats prometteurs lorsque le TPA est utilisé comme méthode d'administration (**Otani et al, 1999 ; Johansson et al, 2012 ; Waldmann et al, 2020**). Grâce au TPA, nous avons pu cibler la livraison de gène de l'IL12 par la circulation systémique, cela a permis une bioactivité plus élevée au site cible, offrant un

bénéfice thérapeutique supérieur par rapport aux isoformes natives établies d'IL12 sans toxicité observable dans nos études précliniques tout en évitant leur sensibilité à la clairance rénale et les effets secondaires.

Grace à l'utilisation de la capsid de phage pour encapsider les cassettes de transgène AAV thérapeutiques dans de petites particules d'environ 7 nm de diamètre devrait également permettre au TPA d'échapper à la clairance des particules par le système immunitaire des mammifères, qui a toujours été un obstacle observé dans les vecteurs viraux (**Shirley et al, 2020**). Et grâce aux propriétés antitumorales de l'IL12, nous avons constamment observé une réduction du volume de la tumeur au fil des administrations répétées, indiquant une efficacité accumulée dans les modèles de souris immunocompétentes.

Dans le contexte de l'immunothérapie, nous pensons que les particules de TPA possèdent un potentiel considérable de traduction clinique en raison de leurs avantages en termes de coût et de sécurité par rapport aux traitements à base de cytokines et aux vecteurs viraux actuellement disponibles. L'immunothérapie est extrêmement coûteuse, nécessitant souvent la conjugaison des cytokines à un anticorps monoclonal pour piloter la spécificité de la cible. Les programmes de traitement qui en résultent peuvent coûter plus de 100 000 dollars américains par années de vie ajustées sur la qualité (**Verma et al, 2018**). Au contraire, les particules de TPA ciblées sont fabriquées à l'aide d'un système bactériophage modifié et largement utilisé, ne nécessitent pas de matières premières coûteuses (telles que des plasmides d'ADN purifiés) et peuvent être produites à l'échelle commerciale avec les normes de bonnes pratiques de fabrication (BPF), (**Kotin, 2011**). En termes de sécurité, les bactériophages ont un historique positif et long en tant qu'antibiotiques et additifs alimentaires approuvés par la FDA des États-Unis (**Moye et al, 2018**). Une étude d'innocuité de la thérapie anticancéreuse guidée par les phages chez les chiens de compagnie a également montré des données d'innocuité prometteuses, ainsi qu'une tolérance par le système immunitaire après administration répétée (**Paoloni et al, 2009**).

## Conclusion

Les particules dérivées de phages nouvellement développées peuvent être appliquées pour une thérapie sélective et efficace par cytokines. Ces résultats sont importants puisque la livraison ciblée de cytokines a été un obstacle majeur à la traduction clinique. Étant donné que les cytokines ont déjà été testées chez des patients cancéreux et que l'innocuité des phages chez l'homme est de plus en plus établie, l'efficacité clinique de cette thérapie ciblée par cytokines pour traiter les tumeurs solides est prometteuse. De plus, le traitement est administré par voie systémique et pourrait donc être appliqué à la fois à une maladie localisée et métastatique. On pourrait supposer aussi qu'une large gamme d'immunothérapies anticancéreuses actuelles seront rendues plus sûres et plus efficaces contre les tumeurs solides en combinaison avec les particules de TPA. Par exemple, la délivrance systémique de constructions TPA portant des cassettes transgéniques codant pour des anticorps peut être utilisée pour la production ciblée d'anticorps pour le blocage du point de contrôle immunitaire. Les ligands des cellules CAR T, telles que CD19, peuvent être exprimés sélectivement dans les tumeurs solides par le TPA pour guider la thérapie cellulaire CAR T. Le TPA ciblé sur les tumeurs peut également être utilisé dans les vaccins anticancéreux pour exprimer des antigènes étrangers dans les tumeurs et les marquer en vue de leur destruction.

## Liste des références

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. Molecular biology of the cell 6th edition page 1105 2002.
- Allen, F.; Rauhe, P.; Askew, D.; Tong, A.A.; Nthale, J.; Eid, S.; Myers, J.T.; Tong, C.; Huang, A.Y. Ccl3 enhances antitumor immune priming in the lymph node via ifn $\gamma$  with dependency on natural killer cells. *Front. Immunol.* 2017.
- Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Chimiothérapie anticancéreuse. [Consulté le 3 mai 2022]. Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 janvier-. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>.
- Ann E. Lin PhD, Tumor Antigen Targets for Personalized Adoptive T Cell Therapies 2019.
- Akakura K. [Hormonal therapy for advanced prostate cancer: current status and issues]. *Nihon Rinsho.* 2016.
- Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. L'interleukine 12 (IL-12) induit la phosphorylation de la tyrosine de JAK2 et TYK2 : utilisation différentielle des tyrosine kinases de la famille Janus par l'IL-2 et l'IL-12. *J Exp Méd.* 1995.
- Bao, R.; Selvakumaran, M.; Hamilton, T.C. Targeted gene therapy of ovarian cancer using an ovarian-specific promoter. *Gynecol. Oncol* 2002.
- Bekaii-Saab, T.S.; Roda, J.M.; Guenterberg, K.D.; Ramaswamy, B.; Young, D.C.; Ferketich, A.K.; Lamb, T.A.; Grever, M.R.; Shapiro, C.L.; Carson, W.E. A phase I trial of paclitaxel and trastuzumab in combination with interleukin-12 in patients with her2/neu-expressing malignancies. *Mol. Cancer Ther* 2009.
- Béliveau & Gingras. *Les aliments contre le cancer* 2007.
- Berraondo P, Etcheberria I, Ponz-Sarvisé M, Melero Revisiting Interleukin-12 as a cancer immunotherapy agent *Clin Cancer Res* 2008.
- Bonifant, C.L.; Jackson, H.J.; Brentjens, R.J.; Curran, K.J. Toxicity and management in car T-cell therapy. *Mol. Ther.-Oncolytics* 2016.
- Brun J.-L., D. Riethmuller Vaccination prophylactique et thérapeutique contre le papillomavirus humain 2008.
- Cao, X.; Leonard, K.; Collins, L.I.; Cai, S.F.; Mayer, J.C.; Payton, J.E.; Walter, M.J.; Piwnica-Worms, D.; Schreiber, R.D.; Ley, T.J. Interleukin 12 stimulates ifn- $\gamma$ -mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance. *Cancer Res.* 2009, 69, 8700–8709.
- Carnets des ECN, Cancérologie, A. Samogyi, M. Azagury, L. Arassus, Partie 1, Module 10, Item 138, Page 19.

- Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux. *Medecine/Sciences* 2019.
- Cheng, L.; Ziegelhoffer, P.R.; Yang, N.S. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993.
- Chiocca, E.A.; John, S.Y.; Lukas, R.V.; Solomon, I.H.; Ligon, K.L.; Nakashima, H.; Triggs, D.A.; Reardon, D.A.; Wen, P.; Stopa, B.M. Regulatable interleukin-12 gene therapy in patients with recurrent high-grade glioma: Results of a phase 1 trial. *Sci. Transl. Med.* 2019.
- Cooper GM. *La cellule : une approche moléculaire*. 2ème édition. Sunderland (Massachusetts) : Sinauer Associates. *Le développement et les causes du cancer* 2000. [Consulté le 8 mars] Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Deplanque, G.; Shabafrouz, K.; Obeid, M. Can local radiotherapy and il-12 synergise to overcome the immunosuppressive tumor microenvironment and allow “in situ tumor vaccination”? *Cancer Immunol. Immunother* 2017.
- Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R, Gately MK. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* 1992.
- Díaz-Montero, C.M.; el Naggar, S.; al Khami, A.; el Naggar, R.; Montero, A.J.; Cole, D.J.; Salem, M.L. Priming of naive cd8+ T cells in the presence of il-12 selectively enhances the survival of cd8+ cd62l hi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. *Cancer Immunol. Immunother* 2008.
- Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur)* 2017.
- Dunn et al., *Annual Review of Immunology*, 2004.
- Durali D, de Goer de Herve MG, Giron-Michel J, Azzarone B, Delfraissy JF, Taoufik Y. Dans les cellules B humaines, l'IL-12 déclenche une cascade d'événements moléculaires similaires à l'engagement Th1. *Sang* 2003.
- Elia D. Tait Wojno,<sup>1</sup> Christopher A. Hunter,<sup>2</sup> \* and Jason S. Stumhofer<sup>3</sup> *The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery* 2019.
- Effrosyni Tsafa, Mariam Al-Bahrani, Kaoutar Bentayebi, Justyna Przystal, Keittisak Suwan, Amin Hajitou. The natural dietary genistein boosts bacteriophage-mediated cancer cell killing by improving phage-targeted tumor cell transduction July 18, 2016.
- Fecker, L.F.; Ruckert, S.; Kurbanov, B.M.; Schmude, M.; Stockfleth, E.; Fechner, H.; Eberle, J. Efficient melanoma cell killing and reduced melanoma growth in mice by a selective replicating adenovirus armed with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Hum. Gene Ther.* 2011.
- Garris, C.S.; Arlauckas, S.P.; Kohler, R.H.; Trefny, M.P.; Garren, S.; Piot, C.; Engblom, C.; Pfirschke, C.; Siwicki, M.; Gungabeesoon, J. Successful anti-pd-1 cancer

immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines ifn- $\gamma$  and il-12. *Immunity* 2018.

- Georges Köhler, César Milstein et Niels Jerne, de se voir décerner le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1984.
- Gotoh, A.; Ko, S.C.; Shirakawa, T.; Cheon, J.; Kao, C.; Miyamoto, T.; Gardner, T.A.; Ho, L.J.; Cleutjens, C.B.; Trapman, J.; et al. Development of prostate-specific antigen promoter-based gene therapy for androgen-independent human prostate cancer. *J. Urol.* 1998.
- Granier C, Karaki S, Roussel H, Badoual C, Tran T, Anson M, et al. Immunothérapie des cancers : rationnel et avancées récentes. *La Revue de Médecine Interne* 2016.
- Hajitou, A. Targeted systemic gene therapy and molecular imaging of cancer contribution of the vascular-targeted aavp vector. *Adv. Genet* 2010.
- Hajitou, A.; Rangel, R.; Trepel, M.; Soghomonyan, S.; Gelovani, J.G.; Alauddin, M.M.; Pasqualini, R.; Arap, W. Design and construction of targeted aavp vectors for mammalian cell transduction. *Nat. Protoc.* 2007.
- Hajitou, A.; Trepel, M.; Lilley, C.E.; Soghomonyan, S.; Alauddin, M.M.; Marini, F.C., 3rd; Restel, B.H.; Ozawa, M.G.; Moya, C.A.; Rangel, R.; et al. A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell* 2006.
- Hajitou, A.; Pasqualini, R.; Arap, W. Vascular targeting: Recent advances and therapeutic perspectives. *Trends Cardiovasc. Med.* 2006.
- Hamid Echchakir, Guillaume Dorothée, Isabelle Vergnon, Salem Chouaib, Fathia Mami-Chouaib Les antigènes associés aux tumeurs humaines : de leur identification à leur utilisation thérapeutique 2001.
- Hewitt, S.L.; Bailey, D.; Zielinski, J.; Apte, A.; Musenge, F.; Karp, R.; Burke, S.; Garcon, F.; Mishra, A.; Gurumurthy, S. Intratumoral interleukin-12 mrna therapy promotes th1 transformation of the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 2020.
- Hunter T Cooperation between oncogenes. 1991.
- Hugo.H, Nadia.B, Frédéric.M, Caroline.R. Hyperprogression d'un carcinome épidermoïde cutané et poussée évolutive d'une maladie de Waldenström au cours d'une immunothérapie par anticorps anti-PD1.
- Mathilde Calvez Immunothérapie et cancers 2021. <https://planetvie.ens.fr/thematiques/sante/pharmacologie/immunotherapie-et-cancers7>
- Jake Shortt, [Ricky Johnstone](#) Oncogenes in Cell Survival and Cell Death 2012.
- Jenner, R.G.; Townsend, M.J.; Jackson, I.; Sun, K.; Bouwman, R.D.; Young, R.A.; Glimcher, L.H.; Lord, G.M. The transcription factors t-bet and gata-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 2009.

- Johansson A, Hamzah J, Payne CJ, Ganss R Le TNFalpha ciblé sur la tumeur stabilise les vaisseaux tumoraux et améliore l'immunothérapie active 2012.
- Kerkar, S.P.; Muranski, P.; Kaiser, A.; Boni, A.; Sanchez-Perez, L.; Yu, Z.; Palmer, D.C.; Reger, R.N.; Borman, Z.A.; Zhang, L. Tumor-specific cd8+ t cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer Res*, 2010.
- Kia, A.; Przystal, J.M.; Nianiaris, N.; Mazarakis, N.D.; Mintz, P.J.; Hajitou, A. Dual systemic tumor targeting with ligand-directed phage and grp78 promoter induces tumor regression. *Mol. Cancer Ther.* 2012.
- Koneru, M.; Purdon, T.J.; Spriggs, D.; Koneru, S.; Brentjens, R.J. Il-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology* 2015.
- Kotin RM Production de virus adéno-associés recombinants à grande échelle. *Hum Mol Genet* 2011.
- Kueberuwa, G.; Kalaitidou, M.; Cheadle, E.; Hawkins, R.E.; Gilham, D.E. Cd19 car T cells expressing il-12 eradicate lymphoma in fully lymphoreplete mice through induction of host immunity. *Mol. Ther.-Oncolytics* 2018.
- Kunert, A.; Chmielewski, M.; Wijers, R.; Berrevoets, C.; Abken, H.; Debets, R. Intratumoral production of il18, but not il12, by tcr-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology* 2018.
- Lang, L.H. Fda approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology* 2006, 131, 1370, doi:10.1053/j.gastro.2006.
- Lazarevic, V.; Chen, X.; Shim, J.; Hwang, E.; Jang, E.; Bolm, A.; Oukka, M.; Kuchroo, V.; Glimcher, L. Transcription factor t-bet represses th17 differentiation by preventing runx1-mediated activation of the ror7t gene. *Nat. Immunol* 2011.
- Li, S.D.; Huang, L. Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther.* 2006.
- Li, X., Dai, H., Wang, H. et al. Explorer l'immunité innée dans l'immunothérapie du cancer : opportunités et défis. *Cell Mol Immunol* 2021.
- Li, J.; Lin, W.; Chen, H.; Xu, Z.; Ye, Y.; Chen, M. Dual-target il-12-containing nanoparticles enhance t cell functions for cancer immunotherapy. *Cell. Immunol.* 2020.
- Lin, L.; Rayman, P.; Pavicic, P.G.; Tannenbaum, C.; Hamilton, T.; Montero, A.; Ko, J.; Gastman, B.; Finke, J.; Ernstoff, M. Ex vivo conditioning with il-12 protects tumor-infiltrating cd8+ T cells from negative regulation by local ifn- $\gamma$ . *Cancer Immunol. Immunother.* 2019.
- Liu, Y.; Di, S.; Shi, B.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wu, X.; Luo, H.; Wang, H.; Li, Z.; Jiang, H. Armored inducible expression of il-12 enhances antitumor activity of glypican-3-targeted chimeric antigen receptor-engineered T cells in hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* 2019.

- Liu J, Cao S, Kim S, et al. Interleukine-12 : le point sur ses activités immunologiques, de signalisation et de régulation de l'expression des gènes. *Curr Immunol Rev* 2005.
- Maani EV, Maani CV. Radiothérapie. [Mise à jour le 26 octobre 2021]. Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 janvier-. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537036/>
- Majeed H, Gupta V. Effets indésirables de la radiothérapie. [Mise à jour le 20 novembre 2021]. Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563259/>
- Mandal, Ananya. Cancer Classification. News-Medical. <https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification.aspx>. 2019.
- Mathilde Calvez Immunothérapie et cancers 2021. <https://planetvie.ens.fr/thematiques/sante/pharmacologie/immunotherapie-et-cancers>
- Mirlekar, B.; Pylayeva-Gupta, Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers* 2021.
- Miyatake, S.; Iyer, A.; Martuza, R.L.; Rabkin, S.D. Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J. Virol.* 1997.
- Mohammed, Shamayel & Bakshi, Nasir & Chaudhri, Naeem & Akhter, Javed & Akhtar, Mohammed. *Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. Advances in anatomic pathology* 2016.
- Morinobu A, Gadina M, Strober W, et al. La phosphorylation de la sérine STAT4 est essentielle pour la production d'IFN-gamma induite par l'IL-12, mais pas pour la prolifération cellulaire. *Proc Natl Acad Sci US A* 2002.
- Moyo ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Applications bactériophages pour la production et la transformation des aliments 2018.
- Nguyen, K.G.; Vrabel, M.R.; Mantooth, S.M.; Hopkins, J.J.; Wagner, E.S.; Gabaldon, T.A.; Zaharoff, D.A. Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2020.
- Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016.
- Office for national statistics. Cancer registration statistics, England 2017 disponible sur: <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/bulletins/cancerregistrationstatisticsengland/2017>
- Otani T, Nakamura S, Toki M, Motoda R, Kurimoto M, Orita K Identification de cellules productrices d'IFN-gamma chez des souris traitées à l'IL-12/IL-18 1999.
- Pardo, Ricardo & Molofsky, Anna & He, S & Morrison, Sean. . Stem Cell Self-Renewal and Cancer Cell Proliferation Are Regulated by Common Networks That Balance the Activation of Proto-oncogenes and Tumor Suppressors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2005.

- Paoloni, M.C.; Tandle, A.; Mazcko, C.; Hanna, E.; Kachala, S.; Leblanc, A.; Newman, S.; Vail, D.; Henry, C.; Thamm, D.; et al. Launching a novel preclinical infrastructure: Comparative oncology trials consortium directed therapeutic targeting of TNFalpha to cancer vasculature. PLoS One 2009.
- Patrice.D, Francis.G, Immunothérapie par anticorps monoclonaux : ingénierie, indications et perspectives 2017.
- Premal Thaker, MD, et Charles Leath, MD la recherche se développe sur l'utilisation de l'interleukine-12 en tant qu'agent anticancéreux 2016.
- Przystal JM, Umukoro E, Stoneham CA, Yata T, O'Neill K, Syed N, Hajitou A. L'inhibition du protéasome dans le cancer est associée à un ciblage tumoral accru par le virus/phage adéno-associé 2013.
- Przystal JM, Waramit S, Pranjol MZI, Yan W, Chu G, Chongchai A, Samarth G, Olaciregui NG, Tabatabai G, Carcaboso AM et al. Efficacité de la thérapie génique systémique ciblée sur les phages activés par le témozolomide dans le glioblastome humain 2019.
- Rameshbabu, S; Labadie, BW; Argulian, A.; Patnaik, A. Cibler l'immunité innée dans le traitement du cancer. Vaccins 2021. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vaccines9020138>
- Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T Cilengitide : un peptide d'acide arginine-glycine-aspartique ciblant l'intégrine avec une activité prometteuse pour le glioblastome multiforme 2008.
- Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. Autoimmunity. 2010.
- Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J Immunol. 2014.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N Engl J Med. 1985.
- Rodriguez, R.; Schuur, E.R.; Lim, H.Y.; Henderson, G.A.; Simons, J.W.; Henderson, D.R. Prostate attenuated replication competent adenovirus (arca) cn706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. Cancer Res. 1997.
- Robson, T.; Hirst, D.G. Transcriptional targeting in cancer gene therapy. J. Biomed. Biotechnol. 2003.
- Rosen RD, Sapra A. Classification TNM. [Mise à jour le 17 février 2022]. Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 janvier-. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
- Sadeghi, H.; Hitt, M.M. Transcriptionally targeted adenovirus vectors. Curr. Gene Ther. 2005.

- Servier Medical Art site web: <https://smart.servier.com/> [consulté le 10 mai]
- Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, Herzog RW Réponses immunitaires aux vecteurs viraux de thérapie génique 2020.
- Starobova H, Vetter I. Physiopathologie de la neuropathie périphérique induite par la chimiothérapie. *Avant Mol Neurosci.* 2017.
- Stoneham CA, Hollinshead M, Hajitou A Endocytose médiée par la clathrine et trafic endo-lysosomal ultérieur de virus/phage adéno-associé 2012.
- Système immunitaire et cancer | Roche [Internet]. Disponible sur: <https://www.roche.fr/fr/pharma/cancer/immunotherapie/systeme-immunitaire-cancer.html>
- Tandle, A.; Hanna, E.; Lorang, D.; Hajitou, A.; Moya, C.A.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Adem, A.; Starker, E.; Hewitt, S.; et al. Tumor vasculature-targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer* 2009.
- Tartour E, Bellet D, Lemoine F, Teisserenc HM, Pagès F. Mécanismes de l'immunosurveillance antitumorale.
- The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - March, 2021. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/504-morocco-fact-sheets.pdf>
- Thieu, V.T.; Yu, Q.; Chang, H.-C.; Yeh, N.; Nguyen, E.T.; Sehra, S.; Kaplan, M.H. Stat4 is required for t-bet to promote il-12-dependent th1 fate determination. *Immunity* 2008.
- Traitement cancer - Les différents traitements du cancer | Roche [Internet]. Disponible sur : <https://www.roche.fr/fr/patients/info-patients-cancer/traitement-cancer/traitementscancer.html> [consulté le 7 mai].
- Traitements-cancers-2011-06\_0.pdf [Internet]. Disponible sur : [https://www.liguecancer.net/sites/default/files/brochures/traitements-cancers-2011-06\\_0.pdf](https://www.liguecancer.net/sites/default/files/brochures/traitements-cancers-2011-06_0.pdf) [consulté le 7 mai].
- Tsafa E, Bentayebi K, Topanurak S, Yata T, Przystal J, Fongmoon D, Hajji N, Waramit S, Suwan K, Hajitou A. Doxorubicin Improves Cancer Cell Targeting by Filamentous Phage Gene Delivery Vectors. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 23;21(21):7867. doi: 10.3390/ijms21217867. PMID: 33114050; PMCID: PMC7660303.
- Tubiana. Généralité sur la cancérogenèse 2008.
- Tugues, S.; Burkhard, S.; Ohs, I.; Vrohling, M.; Nussbaum, K.; Berg, J.V.; Kulig, P.; Becher, B. New insights into il-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* 2015, 22, 237–246.
- Tugues, S., Burkhard, S., Ohs, I. et al. Nouvelles connaissances sur la suppression tumorale médiée par l'IL-12. *La mort cellulaire diffère* 2015.

- Verma V, Sprave T, Haque W, Simone CB, Chang JY, Welsh JW, Thomas CR. Une revue systématique des études de coût et de rentabilité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires . J Immunother Cancer 2018.
- Vesely, M. D. & Schreiber, R. D. Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. Ann N Y AcadSci 1284, 1R5 2014.
- Visconti R, Gadina M, Chiariello M, et al. Importance de la voie MKK6/p38 pour la phosphorylation de la sérine STAT4 induite par l'interleukine-12 et l'activité transcriptionnelle. Sang. 2000.
- Waehler, R.; Russell, S.J.; Curiel, D.T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. Nat. Rev. Genet 2007.
- Waldman A. et al. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. Nature Reviews Immunology 2020.
- Wang, P.; Li, X.; Wang, J.; Gao, D.; Li, Y.; Li, H.; Chu, Y.; Zhang, Z.; Liu, H.; Jiang, G. Re-designing interleukin-12 to enhance its safety and potential as an anti-tumor immunotherapeutic agent. Nat. Commun. 2017.
- Weston A, Harris CC. Carcinogénèse en plusieurs étapes. Dans : Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., éditeurs. Médecine du cancer Holland-Frei. 6ème édition. Hamilton (Ont.) : BC Decker; 2003. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- Wojno, E.D.T.; Hunter, C.A.; Stumhofer, J.S. The immunobiology of the interleukin-12 family: Room for discovery. Immunity 2019.
- Yamasaki H., Krutovskikh V., Mesnil M., Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis, 1999.
- Yata T, Lee EL, Suwan K, Syed N, Asavarut P, Hajitou A La modulation de la matrice extracellulaire dans le cancer est associée à un ciblage accru des cellules tumorales par les vecteurs bactériophages. Mol Cancer 2019.
- Yoo JK, Cho JH, Lee SW, Sung YC. L'IL-12 fournit des signaux de prolifération et de survie aux lymphocytes T CD4+ murins via la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. J Immunol 2002.
- Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi J. Interleukins and cancer immunotherapy. Immunotherapy 2009.
- Yuan Z, Syrkin G, Adem A, Geha R, Pastoriza J, Vrikshajanani C, Smith T, Quinn TJ, Alemu G, Cho H et al Blocage des inhibiteurs de l'apoptose (IAP) en combinaison avec la délivrance ciblée de le facteur de nécrose tumorale alpha conduit à une activité antitumorale synergique 2013.
- Zundler, S.; Neurath, M.F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2015.
- Zwirner, N.W.; Ziblat, A. Regulation of nk cell activation and effector functions by the il-12 family of cytokines: The case of il-27.Front. Immunol 2017.