

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2016

THESE N°: 279

## BACTERIOTHERAPIE ONCOLYTIQUE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : .....

PAR

Mr MOHAMED-TAHA TAGMOUTI

Né le 05 Avril 1990 à Agadir

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

**MOTS CLES** : Bactériothérapie oncolytique – Thérapie combinée – Thérapie génique –  
Mécanismes – Salmonella – Clostridium.

### JURY

**Pr. M. ZOUHDI**

Professeur de Microbiologie

PRESIDENT

**Pr. S. EL HAMZAoui**

Professeur de Microbiologie

RAPPORTEUR

**Pr. M. ICHOU**

Professeur d'Oncologie Médicale

**Pr. A. LAATIRIS**

Professeur de Pharmacie Galénique

**Pr. S. TELLAL**

Professeur de Biochimie

JUGES

**Pr. Y. SEKHSOUKH**

Professeur de Microbiologie

**Pr. A. GAOUZI**

Professeur de Pédiatrie



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

**DOYENS HONORAIRES :**

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ  
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

**ADMINISTRATION :**

**Doyen** : Professeur Mohamed ADNAOUI  
**Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes**  
Professeur Mohammed AHALLAT  
**Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération**  
Professeur Taoufiq DAKKA  
**Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie**  
Professeur Jamal TAOUFIK  
**Secrétaire Général** : Mr. El Hassane AHALLAT

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS  
ET PHARMACIENS**

**PROFESSEURS :**

**Mai et Octobre 1981**

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

**Mai et Novembre 1982**

Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
-------------------------	----------------------

**Novembre 1983**

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI	Rhumatologie
-------------------------------	--------------

**Décembre 1984**

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i>Clinique Royale</i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	Pathologie Chirurgicale

**Novembre et Décembre 1985**

Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
Pr. BENSALID Younes	Pathologie Chirurgicale
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie

### **Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. AJANA Ali  
Pr. CHAHED OUZZANI Houria  
Pr. EL YAACOUBI Moradh  
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah  
Pr. LACHKAR Hassan  
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie  
Gastro-Entérologie  
Traumatologie Orthopédie  
Gastro-Entérologie  
Médecine Interne  
Neurologie

### **Décembre 1988**

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib  
Pr. DAFIRI Rachida  
Pr. HERMAS Mohamed

Chirurgie Pédiatrique  
Radiologie  
Traumatologie Orthopédie

### **Décembre 1989**

Pr. ADNAOUI Mohamed  
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali\*  
Pr. CHAD Bouziane  
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – *Doyen de la FMPR*  
Cardiologie  
Pathologie Chirurgicale  
Neurologie

### **Janvier et Novembre 1990**

Pr. CHKOFF Rachid  
Pr. HACHIM Mohammed\*  
Pr. KHARBACH Aïcha  
Pr. MANSOURI Fatima  
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale  
Médecine-Interne  
Gynécologie -Obstétrique  
Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation

### **Février Avril Juillet et Décembre 1991**

Pr. AL HAMANY Zaïtounia  
Pr. AZZOUZI Abderrahim  
Pr. BAYAHIA Rabéa  
Pr. BELKOUCHI Abdelkader  
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif  
Pr. BENSOUDA Yahia  
Pr. BERRAHO Amina  
Pr. BEZZAD Rachid  
Pr. CHABRAOUI Layachi  
Pr. CHERRAH Yahia  
Pr. CHOKAIRI Omar  
Pr. KHATTAB Mohamed  
Pr. SOULAYMANI Rachida  
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation – *Doyen de la FMPO*  
Néphrologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pharmacie galénique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Biochimie et Chimie  
Pharmacologie  
Histologie Embryologie  
Pédiatrie  
Pharmacologie – *Dir. du Centre National PV*  
Chimie thérapeutique

### **Décembre 1992**

Pr. AHALLAT Mohamed  
Pr. BENSOUDA Adil  
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib

Chirurgie Générale  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie

Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBI Chafiq  
Pr. DAOUDI Rajae  
Pr. DEHAYNI Mohamed\*  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad  
Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Noureddine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid  
Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. EL AOUAD Rajae  
Pr. EL BARDOUNI Ahmed  
Pr. EL HASSANI My Rachid  
Pr. ERROUGANI Abdelkader  
Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. HADRI Larbi\*  
Pr. HASSAM Badredine  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. JELTHI Ahmed  
Pr. MAHFOUD Mustapha  
Pr. MOUDENE Ahmed\*  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. ABDELHAK M'barek  
Pr. BELAIDI Halima  
Pr. BRAHMI Rida Slimane  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHAMI Ilham  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. EL ABBADI Najia  
Pr. HANINE Ahmed\*  
Pr. JALIL Abdelouahed

Gastro-Entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Microbiologie

Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Gynécologie Obstétrique  
Immunologie  
Traumato-Orthopédie  
Radiologie  
Chirurgie Générale- *Directeur CHIS*  
Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Médecine Interne  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Anatomie Pathologique  
Traumatologie – Orthopédie  
Traumatologie- Orthopédie  
Gynécologie –Obstétrique  
Dermatologie

Urologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Neurologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Gynécologie Obstétrique  
Traumatologie – Orthopédie  
Radiologie  
Ophtalmologie  
Neurochirurgie  
Radiologie  
Chirurgie Générale

Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. CHAARI Jilali\*  
Pr. DIMOU M'barek\*  
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine\*  
Pr. EL MESNAOUI Abbas  
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Cardiologie - *Dir. HMIMV*  
Urologie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

### **Décembre 1996**

Pr. AMIL Touriya\*  
Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan  
Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. MAHFOUDI M'barek\*  
Pr. MOHAMMADI Mohamed  
Pr. OUADGHIRI Mohamed  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Traumatologie-Orthopédie  
Néphrologie  
Cardiologie

### **Novembre 1997**

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BEN SLIMANE Lounis  
Pr. BIROUK Nazha  
Pr. CHAOUIR Souad\*  
Pr. ERREIMI Naima  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. HAIMEUR Charki\*  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. OUAHABI Hamid\*  
Pr. TAOUFIQ Jallal

Gynécologie-Obstétrique  
Urologie  
Neurologie  
Radiologie  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Neurologie  
Psychiatrie

Pr. YOUSFI MALKI Mounia

**Novembre 1998**

Pr. AFIFI RAJAA  
Pr. BENOMAR ALI  
Pr. BOUGTAB Abdesslam  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. EZZAITOUNI Fatima  
Pr. LAZRAK Khalid \*  
Pr. BENKIRANE Majid\*  
Pr. KHATOURI ALI\*  
Pr. LABRAIMI Ahmed\*

**Janvier 2000**

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. ISMAILI Hassane\*  
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

**Novembre 2000**

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AIT OURHROUI Mohamed  
Pr. AJANA Fatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. HSSAIDA Rachid\*  
Pr. LAHLOU Abdou  
Pr. MAFTAH Mohamed\*  
Pr. MAHASSINI Najat  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
Pr. NASSIH Mohamed\*  
Pr. ROUIMI Abdelhadi\*

Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie  
Neurologie – *Doyen Abulcassis*  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Néphrologie  
Traumatologie Orthopédie  
Hématologie  
Cardiologie  
Anatomie Pathologique

Pneumophtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Traumatologie Orthopédie  
Anesthésie-Réanimation **inspecteur SS**  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne

Neurologie  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Anesthésie-Réanimation  
Traumatologie Orthopédie  
Neurochirurgie  
Anatomie Pathologique  
Pédiatrie  
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale  
Neurologie

**Décembre 2000**

Pr. ZOHAIR ABDELAH\*

ORL

**Décembre 2001**

Pr. ABABOU Adil  
Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BENABDELJLIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOACHANE Thami  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. DRISSE Sidi Mourad\*  
Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Said  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABBAJ Saad  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-Entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Médecine Interne  
Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie

**Décembre 2002**

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOU Youssef \*  
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques

Pr. BENZEKRI Laila  
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
 Pr. BERNOUSSI Zakiya  
 Pr. BICHRA Mohamed Zakariya\*  
 Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
 Pr. CHKIRATE Bouchra  
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
 Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
 Pr. EL MANSARI Omar\*  
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
 Pr. HAJJI Zakia  
 Pr. IKEN Ali  
 Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
 Pr. KRIOUILE Yamina  
 Pr. LAGHMARI Mina  
 Pr. MABROUK Hfid\*  
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid\*  
 Pr. NAITLHO Abdelhamid\*  
 Pr. OUJILAL Abdelilah  
 Pr. RACHID Khalid \*  
 Pr. RAISS Mohamed  
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
 Pr. RHOU Hakima  
 Pr. SIAH Samir \*  
 Pr. THIMOU Amal  
 Pr. ZENTAR Aziz\*

Dermatologie  
 Gastro-Entérologie  
 Anatomie Pathologique  
 Psychiatrie  
 Chirurgie Générale  
 Pédiatrie  
 Chirurgie Pédiatrique  
 Dermatologie  
 Chirurgie Générale  
 Gynécologie Obstétrique  
 Ophtalmologie  
 Urologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Pédiatrie  
 Ophtalmologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Cardiologie  
 Médecine Interne  
 Oto-Rhino-Laryngologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Chirurgie Générale  
 Pneumophtisiologie  
 Néphrologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Pédiatrie  
 Chirurgie Générale

### **Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
 Pr. AMRANI Mariam  
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
 Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
 Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
 Pr. BOULAADAS Malik  
 Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
 Pr. CHAGAR Belkacem\*  
 Pr. CHERRADI Nadia  
 Pr. EL FENNI Jamal\*  
 Pr. EL HANCHI ZAKI  
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*  
 Pr. HACHI Hafid  
 Pr. JABOUIRIK Fatima  
 Pr. KHABOUZE Samira

Ophtalmologie  
 Anatomie Pathologique  
 Oto-Rhino-Laryngologie  
 Gastro-Entérologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
 Neurologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Anatomie Pathologique  
 Radiologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Pédiatrie  
 Cardiologie  
 Chirurgie Générale  
 Pédiatrie  
 Gynécologie Obstétrique

Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. LEZREK Mohammed\*  
Pr. MOUGHIL Said  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMI Fouad  
Pr. ZARZUR Jamila

Traumatologie Orthopédie  
Urologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Ophtalmologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie

### **Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*  
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid  
Pr. ALLALI Fadoua  
Pr. AMAZOUZI Abdellah  
Pr. AZIZ Nouredine\*  
Pr. BAHIRI Rachid  
Pr. BARKAT Amina  
Pr. BENHALIMA Hanane  
Pr. BENYASS Aatif  
Pr. BERNOUSSI Abdelghani  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed  
Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. EL HAMZAOUI Sakina\*  
Pr. HAJJI Leila  
Pr. HESSISSEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. NIAMANE Radouane\*  
Pr. RAGALA Abdelhak  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Chirurgie Générale  
Microbiologie  
Rhumatologie  
Ophtalmologie  
Radiologie  
Rhumatologie  
Pédiatrie  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale  
Cardiologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Biophysique  
Microbiologie  
Cardiologie (*mise en disponibilité*)  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Rhumatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

### **Décembre 2005**

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

### **Avril 2006**

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. AKJOUJ Said\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie

Pr. ESSAMRI Wafaa  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. GHADOUANE Mohammed\*  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

### **Octobre 2007**

Pr. ABIDI Khalid  
Pr. ACHACHI Leila  
Pr. ACHOUR Abdessamad\*  
Pr. AIT HOUSSA Mahdi\*  
Pr. AMHAJJI Larbi\*  
Pr. AMMAR Haddou\*  
Pr. AOUI Sarra  
Pr. BAITE Abdelouahed\*  
Pr. BALOUCH Lhousaine\*  
Pr. BENZIANE Hamid\*  
Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
Pr. CHARKAOUI Naoual\*  
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader\*  
Pr. ELABSI Mohamed  
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
Pr. EL OMARI Fatima  
Pr. GANA Rachid  
Pr. GHARIB Nouredine  
Pr. HADADI Khalid\*  
Pr. ICHOU Mohamed\*  
Pr. ISMAILI Nadia  
Pr. KEBDANI Tayeb

Gastro-entérologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Urologie  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale  
Pneumo phtisiologie  
Chirurgie générale  
Chirurgie cardio vasculaire  
Traumatologie orthopédie  
ORL  
Parasitologie  
Anesthésie réanimation **directeur ERSSM**  
Biochimie-chimie  
Pharmacie clinique  
Ophtalmologie  
Pharmacie galénique  
Chirurgie générale  
Chirurgie générale  
Anesthésie réanimation  
Psychiatrie  
Neuro chirurgie  
Chirurgie plastique et réparatrice  
Radiothérapie  
Oncologie médicale  
Dermatologie  
Radiothérapie

Pr. LALAOUI SALIM Jaafar\*  
Pr. LOUZI Lhoussain\*  
Pr. MADANI Naoufel  
Pr. MAHI Mohamed\*  
Pr. MARC Karima  
Pr. MASRAR Azlarab  
Pr. MOUTAJ Redouane \*  
Pr. MRABET Mustapha\*  
Pr. MRANI Saad\*  
Pr. OUZZIF Ez zohra\*  
Pr. RABHI Monsef\*  
Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
Pr. SEFFAR Myriame  
Pr. SEKHSOKH Yessine\*  
Pr. SIFAT Hassan\*  
Pr. TABERKANET Mustafa\*  
Pr. TACHFOUTI Samira  
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
Pr. TANANE Mansour\*  
Pr. TLIGUI Houssain  
Pr. TOUATI Zakia

Anesthésie réanimation  
Microbiologie  
Réanimation médicale  
Radiologie  
Pneumo phtisiologie  
Hématologie biologique  
Parasitologie  
Médecine préventive santé publique et hygiène  
Virologie  
Biochimie-chimie  
Médecine interne  
Radiologie  
Microbiologie  
Microbiologie  
Radiothérapie  
Chirurgie vasculaire périphérique  
Ophtalmologie  
Chirurgie générale  
Traumatologie orthopédie  
Parasitologie  
Cardiologie

### **Décembre 2007**

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Ophtalmologie

### **Décembre 2008**

Pr ZOUBIR Mohamed\*  
Pr TAHIRI My El Hassan\*

Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale

### **Mars 2009**

Pr. ABOUZAHIR Ali\*  
Pr. AGDR Aomar\*  
Pr. AIT ALI Abdelmounaim\*  
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
Pr. AKHADDAR Ali\*  
Pr. ALLALI Nazik  
Pr. AMAHZOUNE Brahim\*  
Pr. AMINE Bouchra  
Pr. ARKHA Yassir  
Pr. AZENDOUR Hicham\*  
Pr. BELYAMANI Lahcen\*  
Pr. BJIJOU Younes  
Pr. BOUHSAIN Sanae\*  
Pr. BOUI Mohammed\*

Médecine interne  
Pédiatre  
Chirurgie Générale  
Neurologie  
Neuro-chirurgie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Rhumatologie  
Neuro-chirurgie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Anatomie  
Biochimie-chimie  
Dermatologie

Pr. BOUNAIM Ahmed\*  
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*  
 Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik\*  
 Pr. DOGHMI Kamal\*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
 Pr. ENNIBI Khalid\*  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. HASSIKOU Hasna \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. KABIRI Meryem  
 Pr. KARBOUBI Lamy  
 Pr. L'KASSIMI Hachemi\*  
 Pr. LAMSAOURI Jamal\*  
 Pr. MARMADÉ Lahcen  
 Pr. MESKINI Toufik  
 Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
 Pr. MSSROURI Rahal  
 Pr. NASSAR Ittimade  
 Pr. OUKERRAJ Latifa  
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*  
 Pr. ZOUHAIR Said\*

Chirurgie Générale  
 Traumatologie orthopédique  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Hématologie clinique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie  
 Médecine interne  
 Gynécologie obstétrique  
 Rhumatologie  
 Gastro-entérologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Microbiologie  
 Chimie Thérapeutique  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Pédiatrie  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie Générale  
 Radiologie  
 Cardiologie  
 Pneumo-phtisiologie  
 Microbiologie

**PROFESSEURS AGRÉGÉS :**

**Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
 Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
 Pr. BELAGUID Abdelaziz  
 Pr. BOUAITY Brahim\*  
 Pr. CHADLI Mariama\*  
 Pr. CHEMSI Mohamed\*  
 Pr. DAMI Abdellah\*  
 Pr. DARBI Abdellatif\*  
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
 Pr. EL HAFIDI Naima  
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
 Pr. EL MAZOUZ Samir  
 Pr. EL SAYEGH Hachem  
 Pr. ERRABIH Ikram  
 Pr. LAMALMI Najat  
 Pr. LEZREK Mounir  
 Pr. MALIH Mohamed\*  
 Pr. MOSADIK Ahlam  
 Pr. MOUJAHID Mountassir\*

Anesthésie réanimation  
 Médecine interne  
 Physiologie  
 ORL  
 Microbiologie  
 Médecine aéronautique  
 Biochimie chimie  
 Radiologie  
 Chirurgie pédiatrique  
 Pédiatrie  
 Radiologie  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Urologie  
 Gastro entérologie  
 Anatomie pathologique  
 Ophtalmologie  
 Pédiatrie  
 Anesthésie Réanimation  
 Chirurgie générale

Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Hématologie  
Anatomie pathologique

### **Mai 2012**

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. BELAIZI Mohamed\*  
Pr. BENCHEBBA Driss\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Psychiatrie  
Traumatologie Orthopédique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie pathologique  
Psychiatrie  
Cardiologie

### **Février 2013**

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOUR Mourad  
Pr. AWAB Almahdi  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
Pr. BENSEFFAJ Nadia  
Pr. BENSGHIR Mustapha\*  
Pr. BENYAHIA Mohammed\*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba  
Pr. CHAIB Ali\*  
Pr. DENDANE Tarek  
Pr. DINI Nouzha\*  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa  
Pr. ELFATEMI Nizare  
Pr. EL GUERROUJ Hasnae  
Pr. EL HARTI Jaouad  
Pr. EL JOUDI Rachid\*  
Pr. EL KABABRI Maria  
Pr. EL KHANNOUSSI Basma

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie biologique  
Informatique Pharmaceutique  
Immunologie  
Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chimie Analytique  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie  
Cardiologie  
Réanimation Médicale  
Pédiatrie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Neuro-Chirurgie  
Médecine Nucléaire  
Chimie Thérapeutique  
Toxicologie  
Pédiatrie  
Anatomie Pathologie

Pr. EL KHLOUFI Samir  
Pr. EL KORAICHI Alae  
Pr. EN-NOUALI Hassane\*  
Pr. ERRGUIG Laila  
Pr. FIKRI Meryim  
Pr. GHANIMI Zineb  
Pr. GHFIR Imade  
Pr. IMANE Zineb  
Pr. IRAQI Hind  
Pr. KABBAJ Hakima  
Pr. KADIRI Mohamed\*  
Pr. LATIB Rachida  
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra  
Pr. MEDDAH Bouchra  
Pr. MELHAOUI Adyl  
Pr. MRABTI Hind  
Pr. NEJJARI Rachid  
Pr. OUBEJJA Houda  
Pr. OUKABLI Mohamed\*  
Pr. RAHALI Younes  
Pr. RATBI Ilham  
Pr. RAHMANI Mounia  
Pr. REDA Karim\*  
Pr. REGRAGUI Wafa  
Pr. RKAIN Hanan  
Pr. ROSTOM Samira  
Pr. ROUAS Lamiaa  
Pr. ROUIBAA Fedoua\*  
Pr. SALIHOUN Mouna  
Pr. SAYAH Rochde  
Pr. SEDDIK Hassan\*  
Pr. ZERHOUNI Hicham  
Pr. ZINE Ali\*

**Avril 2013**

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim\*  
Pr. GHOUNDALE Omar\*  
Pr. ZYANI Mohammad\*

Anatomie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Physiologie  
Radiologie  
Pédiatrie  
Médecine Nucléaire  
Pédiatrie  
Endocrinologie et maladies métaboliques  
Microbiologie  
Psychiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Pharmacologie  
Neuro-chirurgie  
Oncologie Médicale  
Pharmacognosie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie Pathologique  
Pharmacie Galénique  
Génétique  
Neurologie  
Ophtalmologie  
Neurologie  
Physiologie  
Rhumatologie  
Anatomie Pathologique  
Gastro-Entérologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Urologie  
Médecine Interne

***\*Enseignants Militaires***

## 2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

### PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. BARKYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

Mise à jour le 09/01/2015 par le  
Service des Ressources Humaines

- 9 JAN 2015



# *Dédicaces*



*En hommage à mon défunt père, Dieu ait son âme.*

*Un modèle d'honnêteté et de rectitude, un homme grand par ses principes et ses talents, qui nous inculqua à mon frère et à moi le travail comme base, la perfection comme cible. Il nous apprit à ne jamais nous satisfaire du médiocre, à ne jamais céder à la facilité. Il nous apprit à goûter l'effort et l'apprécier. À aimer souffrir et voir couler sa sueur. Car il nous a convaincu qu'au bout du travail honnête et dur, la récompense attendait.*

*Je me rappelle encore comment il nous lisait au lit. Comment dès notre plus jeune âge, il nous mit un livre dans les mains. Une petite bibliothèque dans notre chambre. Une petite encyclopédie colorée qui expliquait en des mots d'enfants la physiologie du corps humain, avec des érythrocytes humanoïdes courant les routes que formaient les vaisseaux, des granulocytes au gros ventre mangeant les virus au visage méchant. Tant d'images et de couleurs que je n'ai jamais oubliées, tant elles me fascinaient.*

*Mais rien ne me fascinait plus que mon père lui-même, paix soit sur son âme. Je l'entendais rentrer tard le soir depuis mon lit, et j'attendais impatiemment le moment où il ouvrirait ma porte, où il s'assoierait au bord de mon lit, où il me raconterait toutes ces aventures qu'il avait vécu aux urgences. J'écoutais avidement, les yeux grands ouverts. Je n'en perdais pas un mot.*

*Mon père était médecin. Mon père était un grand homme. Mon père fit, sans qu'il n'en ait l'intention, que mon frère et moi ne puissions nous voir devenir autre chose que médecins.*

*J'espère, papa, que, là où tu es, tu es fier de moi, et que tu le seras encore plus de mon frère. Ce travail est pour toi.*

*A ma mère, qui aura tout donné pour mon frère et moi. On aura toujours été sa priorité absolue. Elle aura beaucoup souffert pour que nous soyons là où nous sommes aujourd'hui. Notre maman poule nous aura couvé, soigné et protégé, en y mettant tout son être, aux dépends de sa propre personne. J'espère, maman, pouvoir te rendre fière au travers de mon travail. J'espère que je me serais élevé à la hauteur de tes sacrifices.*

*A mon frère, aux liens sacrés qui nous unissent que les mots ne peuvent décrire. Je te souhaite le plus brillant des avenir.*

*A ma grand-mère, au petit havre que représentait sa maison pour moi, mon frère et tous mes cousins, au petit bonheur des « merindas ».*

*A ma grande amie Imane, avec qui j'ai ris, pleuré et mangé du polycopié. Nous avons passé de formidables moments durant nos années à l'université. Ton aide et ton soutien m'auront été précieux tout au long de nos études. Je te remercie particulièrement pour ta contribution à ce travail.*

# *Remerciements*





**À MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE**

*Monsieur Mimoun Zouhdi.*

*Professeur de microbiologie*

*CHU Ibn Sina-Rabat*

*Par votre compétence, votre profond savoir et par la clarté de votre enseignement, vous avez donné à la médecine ses lettres de noblesse.*

*Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.*

*Veillez accepter, cher Maître, dans ce travail, mes sincères remerciements et toute la reconnaissance que je vous témoigne.*

**À MON MAITRE ET DIRECTEUR DE THÈSE**

*Madame Le Colonel Sakina El hamzaoui*

*Professeur de Microbiologie*

*Hôpital militaire Mohammed V*

*Je remercie le bon Dieu de m'avoir fait croiser votre chemin. Et je vous remercie de m'avoir fait confiance pour l'élaboration de ce travail.*

*Je vous suis extrêmement reconnaissant pour toute l'aide que m'avez offerte, tous les efforts que vous avez fournis, et votre disponibilité sans faille.*

*Votre énergie, votre modestie et vos compétences font de vous, madame, un professeur d'exception.*

*Veillez agréer, cher professeur, au travers de ce modeste travail, l'expression de mon plus profond respect.*

**À MON MAITRE ET JUGE DE THÈSE**

*Monsieur Le Colonel Major Mohamed Ichou*

*Professeur d'oncologie médicale*

*Hôpital militaire Mohammed V*

*Vous avez aimablement accepté de juger mon travail et je suis très sensible à cet honneur que vous me faites.*

*Votre simplicité, votre amabilité et votre modestie sont à l'origine de mon admiration.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma gratitude et ma considération.*

*À MON MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE*

*Monsieur Le Colonel Abdelkader Laatiris*

*Professeur de pharmacie galénique*

*Hôpital militaire Mohammed V*

*Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en siégeant parmi mon jury de thèse.*

*J'ai pour vous l'estime et le respect qu'impose votre compétence et votre sérieux,*

*Veillez agréer, cher Maître, l'expression de ma plus sincère gratitude.*

*À MON MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE*

*Madame Le Colonel Saida Tellal*

*Professeur de biochimie*

*Hôpital militaire Mohammed V*

*Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail.*

*Votre compétence, votre sens de l'humanité ainsi que votre modestie sont connus de tous.*

*Veillez agréer, cher Maître, l'expression de ma vive reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.*

*À MON MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE*

*Monsieur le Colonel Yassine Sekhsokh*

*Professeur de microbiologie*

*Hôpital militaire Mohammed V*

*Je vous remercie très sincèrement pour l'honneur que vous me faites en siégeant parmi mon jury de thèse.*

*Je suis particulièrement touché par votre accueil et votre sympathie.*

*Ayez l'assurance, cher Maître, de ma grande estime et mon admiration.*

*À MON MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE*

*Monsieur Ahmed Gaouzi*

*Professeur de Pédiatrie*

*Hôpital d'enfants*

*Vous me faites l'honneur d'accepter avec amabilité de siéger parmi mon jury de thèse.*

*Je porte pour vous tout le respect qu'impose votre savoir et vos compétences.*

*Veillez accepter ce travail, cher Maître, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance.*



## **| LISTES DES ILLUSTRATIONS**

## **| LISTE DES ABREVIATIONS**

5-FC	: 5-Fluorocytosine
5-FU	: 5-Fluorouracile
ACE	: Allele Coupled Exchange
ADEPT	: Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BCG	: Bacille Calmette-Guérin
BIRC5	: Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5
CCL21	: C-C motif Chemokine Ligand 21
CD	: Cytosine Déaminase
CDEPT	: Clostridial-Directed Enzyme Prodrug Therapy
CFU	: Colony Forming Units
CMH I	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité I
COBALT	: Combined Bacteriolytic Therapy
DAMP	: Damage-Associated Molecular Pattern
DEPT	: Directed Enzyme Prodrug Therapy
DR	: Death Receptors
dsRNA	: double stranded RNA
FasL	: Fas Ligand
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast Growth Factor
G-CSF	: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDEPT	: Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy

Gy	: Gray
HER2	: Human Epidermal growth factor Receptor 2
HPV	: Human Papilloma Virus
HSVTK	: Herpès Simplex Virus Thymidine Kinase
IAP	: Inhibitor of Apoptosis Protein
IEP	: Intron Encoded Protein
IL	: Interleukine
INF	: Interféron
IT	: Intra-tumoral
IV	: Intraveineux
LB	: Lymphocyte B
LPS	: Lipopolysaccharide
LT	: Lymphocyte T
MDSC	: Myeloid-Derived Suppressor Cells
MIP-2	: Macrophage Inflammatory Protein 2
mRNA	: ARN messenger
NK	: Natural Killer
NQO1	: NAD(P)H:quinine oxydoréductase
NTR	: Nitroréductase
OBA	: Office of Biotechnology Activities
PAI	: Pathogenicity Island
PAMP	: Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCE	: Prodrug Converting Enzymes
PD-L1	: Programmed Death-Ligand 1
EBV	: Epstein-Barr Virus

RISC	: RNA-Induced Silencing Complex
RNAi	: RNA interference
shRNA	: short hairpin RNA
SiRNA	: Small interfering DNA
SMAC	: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
sNTR	: Nitroréductase optimisée
SPI1	: Salmonella Pathogenicity Island 1
SPI2	: Salmonella Pathogenicity Island 2
spp.	: Species pluralis
T3SS	: Type Three Secretion System
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor $\beta$
T <sub>h</sub> 2	: Lymphocyte T helper
THBS1	: Thrombospondine 1
TIMP-1	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNFSF	: Tumor Necrosis Factor Super Family member
TRAIL	: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg	: T regulatory cells
TTSS	: Type Three Secretion System
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

## | LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>   William B. Coley, connu comme le « père » de l’immunothérapie .	<b>10</b>
<b>Figure 2</b>   Dessin du premier sarcome osseux traité par les toxines de Coley ..	<b>11</b>
<b>Figure 3</b>   Distribution de <i>Bifidobacterium bifidum</i> dans les différents tissus selon le temps, après l’injection intra-tumorale de celui-ci .....	<b>15</b>
<b>Figure 4</b>   <i>Clostridium novyi</i> -NT, forme sporulée et forme végétative .....	<b>26</b>
<b>Figure 5</b>   Zone de nécrose à l’intérieur d’une tumeur solide .....	<b>28</b>
<b>Figure 6</b>   Accumulation de <i>Salmonella</i> dans les régions hypoxiques du microenvironnement tumoral.....	<b>32</b>
<b>Figure 7</b>   Colonisation tumorale par <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 chez la souris immunodéficiente et la souris immunocompétente .....	<b>36</b>
<b>Figure 8</b>   Les bactéries permettent d’atteindre les zones hypoxiques et nécrotiques, inaccessibles aux autres thérapeutiques.....	<b>38</b>
<b>Figure 9</b>   Distribution de <i>Bifidobacterium longum</i> et de <i>Clostridium novyi</i> dans des mélanomes murins B16 .....	<b>39</b>
<b>Figure 10</b>   Colonisation tumorale, hépatique et splénique par différentes bactéries injectées chez la souris porteuse de tumeur .....	<b>41</b>
<b>Figure 11</b>   Prolifération préférentielle de <i>Clostridium</i> dans les régions hypoxiques des tumeurs solides.....	<b>44</b>
<b>Figure 12</b>   Effets de la mutation en SPI1 et en SPI2 sur l’inhibition de la croissance tumorale .....	<b>48</b>

<b>Figure 13</b>   Production de cytokines inflammatoires chez la souris après injection de <i>Bifidobacterium longum</i> et d' <i>Escherichia coli</i> non pathogène .....	<b>64</b>
<b>Figure 14</b>   Structure du LPS sauvage et du LPS de <i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009 $\Delta$ msbB ( <i>msbB</i> -).....	<b>66</b>
<b>Figure 15</b>   Inhibition de la croissance tumorale par les souches <i>msbB</i> - chez la souris .....	<b>70</b>
<b>Figure 16</b>   Electrophorèse des produits de PCR montrant l'élimination du gène de la toxine létale de <i>Clostridium novyi</i> .....	<b>74</b>
<b>Figure 17</b>   Colonisation des différents tissus suite à l'administration d' <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 par différentes voies .....	<b>77</b>
<b>Figure 18</b>   Intérêt de la thérapie combinée dans le ciblage des composantes hypoxiques et vascularisées de la tumeur, associant ici le <i>Clostridium novyi-NT</i> aux traitements classiques .....	<b>85</b>
<b>Figure 19</b>   Impact sur la croissance tumorale de la radiothérapie seule et associée à <i>Salmonella</i> .....	<b>89</b>
<b>Figure 20</b>   Impact sur la croissance tumorale de l'administration de <i>Salmonella</i> seule, de l'irradiation seule et de l'administration des deux à la fois.	<b>90</b>
<b>Figure 21</b>   Quantification des effets de la stratégie COBALT sur des tumeurs HCT116 implantées chez les souris nudes .....	<b>93</b>

<b>Figure 22</b>   Nécrose hémorragique secondaire à la stratégie COBALT et comparaison de l'efficacité de la chimiothérapie et de la thérapie combinée après 5 semaines.....	<b>94</b>
<b>Figure 23</b>   Inhibition de l'angiogenèse induite par VEGF et bFGF suite à l'immunisation par <i>Salmonella typhimurium</i> produisant le VEGFR2, mise en évidence sur souris selon le Matrigel assay.....	<b>104</b>
<b>Figure 24</b>   Mécanisme de CDEPT par utilisation du <i>Clostridium sporogenes</i> comme vecteur.....	<b>108</b>
<b>Figure 25</b>   Intégration du gène de la cytosine déaminase dans le plasmide du <i>Bifidobacterium longum</i> , et l'utilisation de celui-ci en tant que thérapie antinéoplasique .....	<b>111</b>
<b>Figure 26</b>   Effet anti-tumoral de <i>Bifidobacterium longum</i> porteur du gène de la cytosine déaminase associé à l'administration orale de 5-Fluorocytosine.....	<b>112</b>

## | LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>   3 classes anaérobies strictes et facultatives testées pour leurs capacités thérapeutiques antinéoplasiques .....	<b>19</b>
<b>Tableau II</b>   Bactéries ciblant et proliférant au niveau du tissu tumoral .....	<b>34</b>
<b>Tableau III</b>   Effet de la mutation en SPI1 et en SPI2 sur la colonisation des cellules tumorales .....	<b>42</b>
<b>Tableau IV</b>   Symptômes anaphylactiques chez le cochon d'inde après administration de <i>Bifidobacterium longum</i> .....	<b>63</b>
<b>Tableau V</b>   Induction de TNF- $\alpha$ par <i>Salmonella msbB</i> <sup>+</sup> et <i>msbB</i> <sup>-</sup> chez la souris et le porc.....	<b>68</b>
<b>Tableau VI</b>   Essais cliniques et précliniques concernant la bactériothérapie anti-tumorale .....	<b>118</b>

# **| *TABLE DES MATIERES***

<b>I. INTRODUCTION :</b>	<b>2</b>
<b>II. HISTORIQUE :</b>	<b>6</b>
<b>III. BACTERIES ONCOLYTIQUES :</b>	<b>18</b>
<b>A. Propriétés :</b>	<b>18</b>
1. Genre <i>Bifidobacterium</i> :	21
2. Genre <i>Salmonella</i> :	21
3. Genre <i>Clostridium</i> :	23
<b>B. Mécanismes d'action :</b>	<b>27</b>
1. Microenvironnement tumoral et hypoxie :	27
2. Colonisation préférentielle du tissu néoplasique :	33
3. Mécanismes de l'oncolyse :	45
a) Mécanismes immuno-indépendants :	46
b) Rôle du système immunitaire :	50
o Tumeur et immunité :	50
o Bactério-oncolyse et immunité :	51
<b>IV. APPROCHE THERAPEUTIQUE ANTINEOPLASIQUE :</b>	<b>56</b>
<b>A. La thérapie antinéoplasique à l'ère pré-bactériothérapique :</b>	<b>56</b>
1. Thérapie antinéoplasique conventionnelle :	56
2. Thérapies ciblées : Molecular Targeted Therapies.....	57
3. Vecteurs inertes de thérapie anticancéreuse : Drug delivery systems for cancer therapy.....	58
4. Mise à profit de l'hypoxie tumorale :	59
5. Cellules souches tumorales :	59
<b>B. Stratégies conceptionnelles bactério-oncolytiques :</b>	<b>60</b>
1. Amélioration de la tolérance :	60
• Utilisation de souches naturellement non-pathogènes :	61
• Inactivation par la chaleur :	65
• Altération du lipopolysaccharide (LPS) immunogène :	65
• Production de souches auxotrophes :	71
• Altération de gènes nécessaires à la survie :	71
• Altération des facteurs de virulence :	72
2. Voies d'administration :	75
3. Oncolyse bactérienne directe :	78

4.	Thérapie combinée :.....	84
a)	Radiofréquence :.....	86
b)	Radiothérapie :.....	87
c)	Chimiothérapie :.....	91
5.	Thérapie génique par vecteurs bactériens : .....	95
a)	Agents inducteurs de mort cellulaire : .....	97
b)	Effecteurs Immunitaires :.....	98
c)	Immunisation anti-tumorale :.....	99
d)	Inhibition de l'angiogénèse :.....	102
e)	Déplétion de molécules essentielles à la survie tumorale :.....	105
f)	Rétablissement de gènes protecteurs : .....	106
g)	Directed Enzyme Prodrug Therapy (DEPT): .....	106
<b>C.</b>	<b>Essais cliniques : .....</b>	<b>117</b>
<b>V.</b>	<b>LIMITES ET PERSPECTIVES : .....</b>	<b>120</b>
•	Réglementation : .....	120
•	Toxicité :.....	122
•	Volume tumoral et vascularisation :.....	122
•	Persistance de la périphérie oxygénée : .....	124
•	Hétérogénéité inter-tumorale :.....	124
•	L'immunisation préexistante contre les bactéries :.....	125
•	Limites des techniques de modification génétique :.....	125
•	Manipulation génétique basée sur les introns du groupe II : .....	127
•	Cellules souches tumorales, hétérogénéité intra-tumorale, immunité anti-tumorale : .....	129
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSION : .....</b>	<b>131</b>
	<b>RESUME :.....</b>	<b>134</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....</b>	<b>138</b>

# **| INTRODUCTION**

## I. INTRODUCTION :

De nos jours, les cancers sont devenus l'une des premières causes de mortalité humaine. 14 millions de nouveaux cas ont été enregistrés dans le monde en 2012 selon l'Organisation Mondiale de la Santé, impliqués dans près de 8.2 millions de décès pour la même année. Ces chiffres bien qu'alarmants se voient facilement éclipsés par les prévisions pour les 15 prochaines années qui annoncent 23.6 millions de cas par an [1].

Face à ce mal qui s'avère être un ennemi coriace, la médecine se retrouve dos au mur. En effet, les thérapeutiques actuelles sont arrivées à leur limite, leur efficacité plombée par le défaut de spécificité et la forte toxicité pouvant, dans certains cas, surpasser la nuisance provoquée par le mal combattu [1-4]. Les progrès scientifiques allant jusqu'à développer des méthodes thérapeutiques nouvelles se sont révélés insuffisants. Une situation que le corps médical peut utiliser à son avantage. En effet, quand les ressources et les options s'éteignent les unes après les autres, quand l'on se retrouve à cours de munitions face à l'ennemi, l'instinct de survie poussé à son maximum s'avère être la meilleure des motivations pour développer un chemin nouveau, une idée novatrice et radicalement différente, une solution ambitieuse et risquée qui serait la seule option salvatrice. Une situation génératrice d'innovation, dans un terreau fertile de progrès technologiques, biologiques et génétiques.

Dans cette optique, une observation des plus intéressantes revêt toute son importance : Il a été noté un rapport entre l'amélioration du niveau d'hygiène et la réduction de l'exposition aux agents infectieux, et l'augmentation exponentielle de l'incidence de la pathologie néoplasique [5]. D'autre part, des

cas de guérison ou de rémission néoplasique inexplicables survenant au décours d'infections intercurrentes ont été notés, et bien qu'isolés, ont pu attirer l'attention des chercheurs et susciter leur intérêt [5-7].

Ainsi vient-on logiquement à se demander ; Contrôle infectieux bactérien, et prépondérance de la maladie néoplasique : y aurait-il un rapport significatif entre les deux événements ? Les infections, notamment bactériennes, masquaient-elles seulement l'impact de la maladie néoplasique en provoquant une mort prématurée ? Ou peut-être agissaient-elles autrement ? Serait-il fou d'imaginer que les infections bactériennes protégeaient des cancers ? Que la découverte de l'antibiothérapie et de la lutte anti-infectieuse, considérée alors comme une victoire contre la mort, soit en fait le détonateur de la pandémie néoplasique ? Serait-il encore plus fou, si cela venait à se confirmer, d'imaginer pouvoir traiter les néoplasies en ayant recours aux agents bactériens ?

Tant de questions aux réponses précieuses dont l'impact pourrait aller jusqu'à remettre en question les modalités de lutte anti-infectieuse, les protocoles antiobiotiques et les programmes d'immunisation à large échelle. Ces questions qui furent longtemps négligées par les chercheurs et qui sont revenues au goût du jour durant la dernière décennie. En effet, il est à noter que les capacités oncolytiques des divers agents infectieux ont largement été sous-étudiées : une simple inquisition sur un moteur de recherche scientifique connu retrouve pour le terme « oncogenic » 1847 références sur les 20 dernières années, contre 235 seulement pour « oncolytic » [5].

Une des explications de ce manque d'intérêt coupablement manifeste est la stigmatisation rattachée aux microorganismes, aussi bien viraux que bactériens [8]. Le terme « bactérie » évoque immédiatement la notion de

pathologie, de danger. L'administration intraveineuse de bactéries est considérée irrationnelle, ne laisserait prévoir que l'induction d'une bactériémie ou d'une septicémie. Pourtant la présence bactérienne à l'intérieur du corps humain ne signifie pas forcément un état pathologique, comme en témoigne la colonisation commensale de différentes portions du corps. Plus encore, elle est nécessaire à sa survie. L'émergence des probiotiques souligne le potentiel bénéfique bactérien, qui peut être développé encore plus.

Au travers de notre étude, nous essaierons d'explorer ce pan de la recherche oncologique, qui semble être une véritable fenêtre sur le futur de la thérapie oncolytique, au champ de développement vaste et prometteur.

# **| HISTORIQUE**

## II. HISTORIQUE :

Depuis plusieurs siècles déjà [9], les observations évoquant l'impact positif de l'infection – notamment bactérienne – sur l'évolution de la pathologie néoplasique ne cessent de s'accumuler.

La découverte et la conquête des Etats-Unis d'Amérique a pu apporter à l'humanité, outre la puissance capitaliste écrasante, des données interpellantes quant à notre sujet ; la population indigène montre une prévalence de la mortalité par cancer très réduite, associée une prévalence conséquente de la pathologie infectieuse [5].

Sur une échelle moins large, les premières régressions tumorales rapportées succédant à un épisode infectieux remontent à plus de 300 ans [10], et des rapports, articles et autres chapitres concernant le sujet n'ont cessé d'affluer depuis [11-16], moyennant 10 rapports par an jusqu'en 2003 [9, 17]. Parmi ceux-ci, une indexation des travaux de William Coley réalisée par sa fille, Helen Coley Nauts, incluant 200 ans de rapports de cas décrivant des rémissions spontanées successives à des épisodes infectieux aigus [18-20].

En 1725, Deidier rapporte que les patients porteurs de syphilis ne développent que peu de tumeurs malignes [21, 22].

En 1813, Vautier rapporte des cas de régression tumorale chez ses patients ayant souffert de gangrène gazeuse, infection grave secondaire au *Clostridium perfringens* [1, 8, 9, 20, 23, 24]. Cette observation est considérée comme étant l'épicentre du phénomène de la bactériothérapie oncolytique, et le point de départ du développement de cette voie [8].

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Coley observe la guérison d'un sarcome à cellules rondes avancé successive à un double épisode d'érysipèle sévère due au *Streptococcus pyogenes*, qui est encore inconnu à l'époque [4, 20, 25, 26]. La rémission du patient persiste pendant au moins 7 ans [20]. Cette observation poussera Coley à explorer davantage le phénomène, et ses travaux constitueront la pierre angulaire de la bactériothérapie oncolytique et de l'immunologie tumorale [8, 9].

Plus récemment, l'*Helicobacter pylori* a été lié à une réduction du risque de cancer de l'œsophage distal et de l'estomac proximal [5, 27].

Un groupe d'étude mené par Nersesyan a démontré en 2002 que le vaccin vivant atténué du bacille de Francis (*Francisella tularensis*, ou anciennement *Pasteurella tularensis*) et celui de l'anthrax réduisent l'incidence et la masse des tumeurs chimiquement induites [28, 29], prolongent leur temps de latence moyen chez les rongeurs de laboratoire [5, 28, 30, 31], et ralentissent la croissance de tumeurs transplantées. L'administration humaine a permis d'augmenter la durée de survie moyenne de patients porteurs de cancer du corps utérin et de cancer pulmonaire [28, 32]. La donnée la plus intéressante découlant de l'étude est l'inactivité totale des vaccins tués sur la croissance tumorale [28], soulignant l'importance de la sub-infection provoquée par les bactéries atténuées.

De telles observations ne sont pas spécifiques aux infections bactériennes. En effet, d'autres semblables ont été relevées au décours d'expositions virales. De nombreux exemples existent, dont celui de l'exposition d'un fermier au virus de la maladie de Newcastle lors d'une épidémie chez sa volaille, qui a conduit à la régression de son carcinome gastrique métastatique [5, 7]. La rougeole

contractée naturellement serait responsable de la régression de la maladie de Hodgkin, du lymphome de Burkitt et de leucémies [5]. Un autre exemple est celui relevé en 1912 par De Pace, médecin Italien, qui note la régression de cancers du col chez des patientes traitées pour rage [6].

Autant de données suggérant la capacité d'agents pathogènes acquis naturellement à occasionnellement attaquer, ou à pousser l'organisme à attaquer le tissu tumoral [5]. L'intérêt suscité par ces révélations conduit naturellement la communauté des chercheurs à explorer le potentiel thérapeutique d'une telle approche.

Les expérimentations se succèdent alors, et ce dès 1868 en Allemagne avec W. Busch qui entreprend d'inoculer à ses patients porteurs de tumeurs inopérables l'érysipèle dans un espoir thérapeutique [9, 23]. Le tout premier patient fut une femme porteuse de sarcome inopérable, que Busch entreprit de mettre dans une literie précédemment occupée par un patient atteint d'érysipèle. En ce temps, l'étiologie streptococcique de l'érysipèle était encore inconnue [9, 33]. Busch rapporte pour cette patiente une régression de moitié du volume de la tumeur primitive, ainsi que du volume des adénopathies cervicales [20, 34]. Cette expérience constitue la première inoculation volontaire de bactéries à un patient cancéreux [4, 20, 34], et s'est soldée par le décès de la patiente 9 jours après le début de l'infection.

En 1882, Friedrich Fehleisen retente la même expérience, et met en évidence le rôle du *Streptococcus pyogenes* comme agent causal de l'érysipèle [9, 20, 34-36].

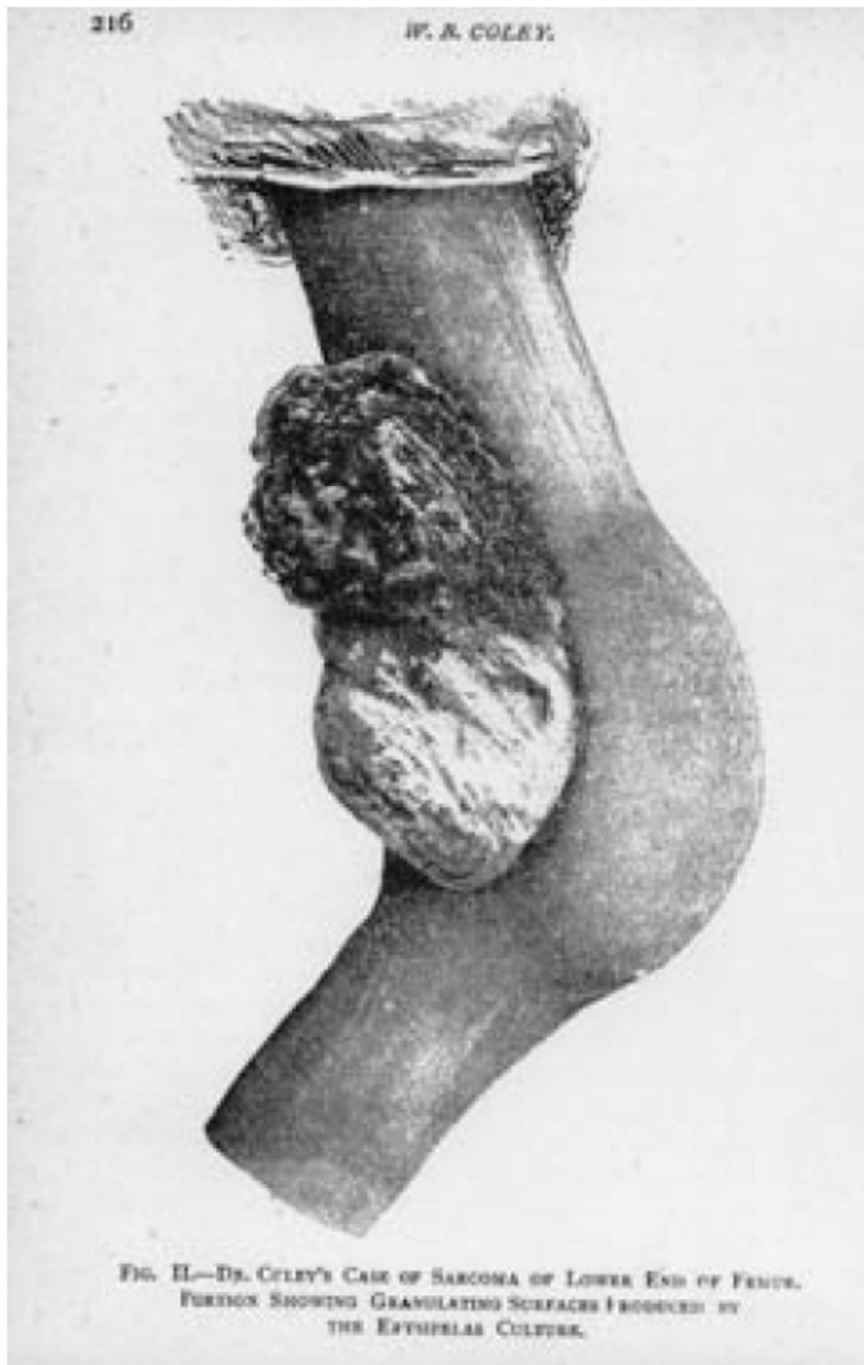
Suivant son observation citée plus haut [4], William B. Coley, chirurgien chef de l'unité des sarcomes osseux du Memorial New York Hospital (Figure 1),

tente en 1890 l'injection de *Streptococcus pyogenes* chez un patient porteur d'une tumeur inopérable et obtient la disparition de la néoplasie [21]. Ce résultat, en plus de ceux des travaux de ses prédécesseurs, l'encourage à entreprendre une expérience à grande échelle qui inclura sur près de 40 ans plus de 1000 patients porteurs de sarcomes de l'os et des tissus mous, chez lesquels sera administré le *Streptococcus pyogenes* inactivé par la chaleur entre autres [4, 8, 9, 21, 34, 37, 38]. Les premiers résultats furent cependant décevants [37, 39], et poussèrent Coley à améliorer la toxicité du *Streptococcus pyogenes*, gram positif, par l'adjonction de *Serratia marcescens*, gram négatif, tous deux inactivés par la chaleur [9, 34]. Il en résulte un succès largement supérieur à celui obtenu par ces prédécesseurs [9, 34, 40, 41], avec des réponses au long terme, bien que l'efficacité soit variable [38]. Cette association de bactéries tuées par la chaleur est communément appelé « toxines de Coley », et est largement utilisée pour le traitement des sarcomes jusqu'en 1963 (Figure 2) [9, 37, 39-41]. Les travaux de Coley, bien que critiqués à leurs débuts puis oubliés avec l'avènement de la chimiothérapie et de la radiothérapie [21], furent d'une importance capitale au développement de l'immunothérapie et de la bactériothérapie oncolytique [8, 9, 21]. Coley sera même désigné par la suite comme « père de l'immunothérapie » [21].



William B. Coley (1862-1936) from *Trans Am Surg Assoc* 54(1936):415. Courtesy of the Welch Library of the History of Medicine.

**Figure 1 :** William B. Coley, connu comme le « père » de l'immunothérapie [21].



Drawing of Coley's first bone sarcoma case treated with his toxins. Courtesy of *Annals of Surgery*/Lippincott.

**Figure 2 :** Dessin du premier sarcome osseux traité par les toxines de Coley [21].

Dans les recherches ultérieures, le choix des bactéries se fit selon leurs caractéristiques qui leur auraient permis une colonisation préférentielle du tissu tumoral. Ainsi les bactéries au caractère anaérobie semblaient-elles les plus à même d'atteindre cet objectif, étant données les caractéristiques du microenvironnement tumoral [38]. Les bactéries du genre *Clostridium* furent ainsi sujettes à de nombreuses expérimentations oncolytiques [9, 38].

Dans les années 20, Parker et al. ont été les premiers à démontrer la formidable capacité oncolytique du *Clostridium*, par l'injection intra-tumorale des spores de *Clostridium histolyticum* chez la souris porteuse de sarcome implanté qui s'est vu suivre d'oncolyse – dénommée liquéfaction à l'époque – et de contrôle tumoral [1, 2, 9, 42]. La sélectivité exquise du système fut confirmée par Malmgren et Flanigan [9, 43] en 1955 [44] qui injectèrent des spores de *Clostridium tetani* par voie veineuse chez des souris porteuses de tumeurs ainsi que chez des souris saines, produisant l'une des meilleures preuves de l'efficacité et de la sélectivité de l'approche bactério-oncolytique [38] : Les animaux porteurs de tumeurs décèdent dans les 48 heures suivant l'injection, conséquence de la production des toxines tétaniques par les bactéries germinant au niveau des foyers tumoraux [9], alors que les animaux non porteurs de tumeur se voient inaffectés par les injections de spores, celles-ci étant incapables de germer en l'absence de tissu tumoral [1, 2, 8, 9, 38].

En 1935, Connell tente une expérience similaire à celle de Parker en injectant des filtrats stériles de *Clostridium histolyticum* en intra-tumoral pour le traitement de cancers avancés. Il obtient une régression tumorale qu'il explique par la production bactérienne d'enzymes protéolytiques [1, 9, 45].

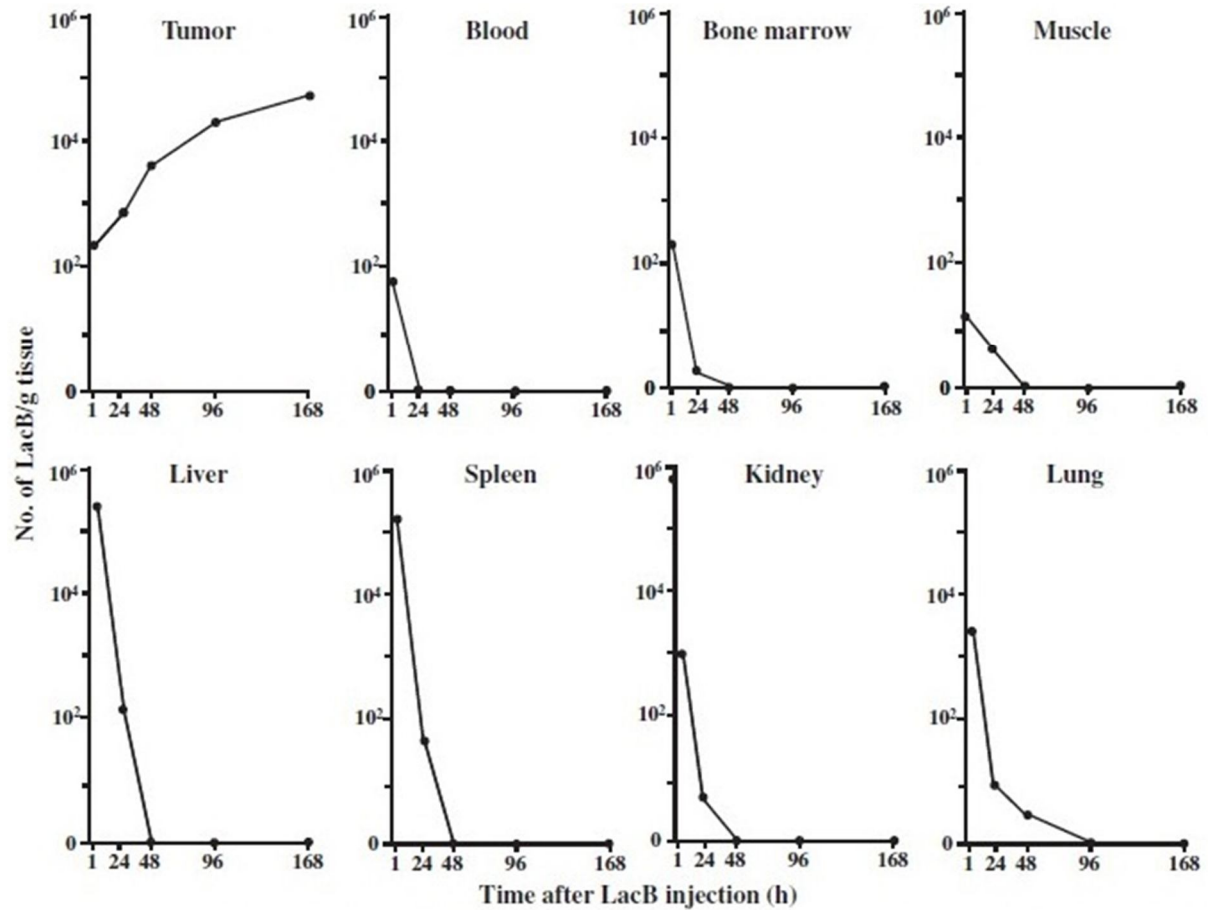
En 1947, le *Clostridium histolyticum* administré par injection intratumorale chez la souris porteuse de sarcome greffé a permis l'obtention de la liquéfaction et de la régression de la tumeur [20, 42]. Cependant, la toxicité importante accompagnant l'oncolyse clostridienne résulte en le décès de la majorité des animaux traités [20, 44, 46-50].

Le *Clostridium butyricum* M-55 non pathogène fut exploré en 1959 par Möse et Möse quant à ses capacités oncolytiques [20, 47] initialement chez la souris, chez qui il produit une lyse extensive des tumeurs transplantées après inoculation intra-veineuse [47], et puis ultérieurement chez l'Homme [1, 44, 47-49]. Möse et Möse décrivent chez l'animal une liquéfaction palpable quelques jours après l'administration, suivie de l'extériorisation spontanée d'un liquide brun nécrotique, avec destruction macroscopiquement complète de la tumeur et persistance tissulaire périphérique mise histologiquement en évidence [20]. Cependant, l'oncolyse extensive conduit dans la presque totalité des cas au décès des animaux traités [20, 47]. Ces résultats probants encouragent à passer aux essais humains ; ainsi, dans une étude conduite par Carey en 1967 [44], 5 patients cancéreux se voient inoculés le *Clostridium butyricum* M-55 par voie intraveineuse. 3 des patients montrent une lyse tumorale, un seul montre une amélioration clinique. Aucune réponse complète n'est cependant retrouvée [38, 44]. A la lumière de ces constatations, la nomenclature de la bactérie subit une révision de *Clostridium butyricum* en *Clostridium oncolyticum*, puis par la suite en *Clostridium sporogenes* M-55 (ATCC 13732) [1].

En 1964, différentes souches non pathogènes de *Clostridium* sont testées sur modèles tumoraux expérimentaux [4].

Le champ de la bactériothérapie oncolytique passe par une période de stagnation interrompue en 1976 par Morales, Eidinger et Bruce qui révèlent l'efficacité thérapeutique du Bacille de Calmette-Guerrin (BCG) sur le cancer superficiel de la vessie [51]. Lequel traitement est toujours à l'ordre du jour, indiqué dans les cancers vésicaux superficiels à haut risque, et mis en œuvre chez près de 1 million de patients par an [5, 9, 34, 52]. Son efficacité est considérée comme étant supérieure à celle des stratégies chimiothérapeutiques conventionnelles pour cette indication [53, 54].

La première preuve du potentiel de *Bifidobacterium* en oncologie vient dans les années 80 lorsque les tumeurs à ascites d'Ehrlich implantées chez la souris ont été traitées par une suspension de la bactérie injectée par voie veineuse, à hauteur de  $5 \cdot 10^6$  Colony Forming Units (CFU) par souris [55]. Il s'en suit une colonisation tumorale spécifique, avec disparition de la bactérie des tissus sains dans les 96 heures suivant l'administration. La concentration bactérienne au niveau tumoral se voit augmenter par contre, passant de  $10^2$  CFU/g à la première heure à  $10^6$  CFU/g le 7<sup>ème</sup> jour (Figure 3). Aucun effet anti-tumoral n'est cependant noté [9, 55].



Specific distribution of *Bifidobacterium bifidum* (LacB) in tumor tissues following a single i.v. injection of  $5 \times 10^6$  viable bacilli into Ehlich solid tumor-bearing mice. Each point represents the mean of the number of bacilli per gram tissue of eight mice.

**Figure 3 :** Distribution de *Bifidobacterium bifidum* dans les différents tissus selon le temps, après l'injection intra-tumorale de celui-ci [8].

Par la suite, de nombreuses autres bactéries prouvent leur capacité à coloniser préférentiellement le tissu tumoral, avec des résultats oncolytiques toutefois variables : *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bifidobacterium spp*, *Mycobacterium bovis* [38].

L'efficacité de l'approche bactério-oncolytique s'est tout de même montrée limitée, justifiant en partie sa mise au placard. Cependant, l'avènement récent de technologies d'altération génétique de plus en plus efficaces et accessibles – notamment la technologie d'ADN recombinant [38] – ressuscite l'intérêt porté aux bactéries antinéoplasiques, et laisse entrevoir un avenir prometteur pour la bactériothérapie [8].

D'autre part, le microenvironnement tumoral a vu son intérêt s'accroître ses dernières années, s'avérant influant dans la physiologie des cellules tumorales et leur sensibilité au traitement [9, 56-58]. La bactériothérapie associée au génie génétique joue des particularités des germes et du microenvironnement pour éliminer les difficultés que présente ce dernier.

# **| BACTERIES ONCOLYTIQUES**

### III. BACTERIES ONCOLYTIQUES :

#### A. Propriétés :

Les anaérobies étudiées jusqu'à présent tombent dans trois catégories : les anaérobies gram positif à acide lactique (lactic acid bacteria), les bactéries gram négatif anaérobies facultatives intracellulaires, et les bactéries gram positif anaérobies strictes saccharolytiques ou protéolytiques (Tableau I) [9].

**Tableau I :** 3 classes anaérobies strictes et facultatives testées pour leurs capacités thérapeutiques antinéoplasiques [9].

Three classes of anaerobic and facultative anaerobes have been tested for anticancer therapy				
Class	Species	Features	Advantages	Disadvantages
<b>Class I:</b> Bifidobacteria	<i>B. longum</i>	Gram <sup>+</sup> non-motile	Non-pathogenic present in common intestinal flora, Have been used in human for many years Probiotic bacteria Can be used for intravenous or oral administration Expression of recombinant protein	No obvious oncolytic effect Non-spore former More susceptible to non-permissive conditions More difficult to store and handle
	<i>B. adolescentis</i>	Gram <sup>+</sup> obligate anaerobes		
	<i>B. infantis</i>			
<b>Class II:</b> Facultative intracellular Bacteria	<i>Salmonella</i>	Gram <sup>-</sup> facultative anaerobes	Attenuated vaccine strain has been proved safe clinically in human, Biochemistry pathways and genomes are well characterized Auxotrophic isolates for solid tumours have intrinsic antitumour activity	Intracellular bacteria, thus may have difficulty to infect and lyse quiescent cell Have a tumour to normal tissue ratio of 1000:1, therefore a significant number of bacteria colonize normal organs Cell wall components are immunogenic
	<i>S. typhimurium</i>	Agent for intestine infection		
	<i>S. choleraesuis</i>			
	<i>Listeria</i>	Gram <sup>+</sup> , facultative anaerobes	Grow under aerobic and anaerobic conditions, thus can target both large and small tumours, enter professional antigen presenting cells and induce strong innate immune response Have the potential as a vaccine vector for tumour therapy Biology is well studied and known	Virulence factors exist, especially LPS in the bacterial cell wall, thus safety is an issue when large amount of bacteria are delivered Virulence factors exist, such as LPS
	<i>L. monocytogenes</i>			
	<i>E. coli</i>	Gram <sup>-</sup> , facultative anaerobes		

Class	Species	Features	Advantages	Disadvantages
<b>Class III:</b> Strictly Anaerobic bacteria	<i>Clostridium</i> Proteolytic <i>C. sporogenes</i> Saccharolytic <i>C. novyi</i> <i>C. butyricum</i> <i>C. acetobutylicum</i> <i>C. oncolyticum</i> <i>C. beijerinckii</i>	Gram <sup>+</sup> , strictly anaerobes normal habitat in the soil, aquatic sediments, and intestinal tract of both animals and humans	Spore former Spores are stable, easy to produce and economic to use Clostridial spores can be delivered non-invasively and systemically, i.e. intravenous injection Have shown extensive oncolytic ability Spores are non-immunogenic and can be repeatedly delivered Oncolysis occurs irrespective of tumour cells' heterogeneity or growth status	Some strains are pathogenic Some strains are difficult to manipulate genetically Only colonize in large tumours with area of hypoxia/necrosis Oncolysis interrupted at the rim causing incomplete tumour lysis

## 1. Genre *Bifidobacterium* :

Le *Bifidobacterium* est une bactérie gram positif anaérobie stricte, immobile, non pathogène, ne produisant pas de spores, saprophyte du tube digestif de mammifères dont l'Homme [9, 20]. Les bactéries du genre ont depuis longtemps été utilisées comme probiotiques et pour la fermentation des produits laitiers ; notamment, le *Bifidobacterium bifidum* qui est prescrit au Japon comme probiotique pour les nourrissons depuis les années 80 [8, 59]. Son caractère naturellement inoffensif est un avantage pour son utilisation thérapeutique oncolytique, en comparaison avec *Salmonella* et *Clostridium* [4, 8].

Des extraits pariétaux cellulaires de la bactérie ont été utilisés comme immuno-modulateurs, à la façon du bacille de Calmette-Guérin [20, 60, 61].

Trois espèces ont particulièrement été étudiées : *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, et *Bifidobacterium adolescentis*. Elles font partie de la flore intestinale commune chez l'Homme, et sont donc considérées comme « sûres », ne présentant pas de risque pathologique [9].

## 2. Genre *Salmonella* :

Les bactéries du genre *Salmonella* sont anaérobies facultatives, gram négatif, pathogènes fréquemment impliqués dans la pathologie digestive chez l'Homme. L'infection systémique à *Salmonella* est responsable de choc septique et de taux de mortalité élevés, dus notamment à la haute immunogénicité du lipopolysaccharide (LPS) présent au niveau de la paroi [4, 9, 20]. Certaines souches auxotrophes présentent cependant une virulence amoindrie chez la souris, mise en évidence par les travaux de Bacon et al. [20, 62-64].

Le genre *Salmonella* est subdivisé en deux espèces : *bongori* et *enterica*, elles-mêmes subdivisées en six sous-espèces, dont *enterica*. Cette dernière présente deux groupes de sérovars : typhoïdes (*Typhi*, *Paratyphi*, *Sendai*...) et non typhoïdes (*Typhimurium*, *Infantis*, *Dublin*...) [3].

*Salmonella enterica enterica Typhimurium* est un bacille flagellé gram négatif, anaérobie facultatif, ne formant pas de spores, génétiquement proche d'*Escherichia coli*, responsable de la fièvre typhoïde murine [65], possédant des caractéristiques naturelles et une aisance quant à la modification de son capital génétique qui font de lui un excellent candidat à l'utilisation thérapeutique [3]. La propriété de colonisation spécifique des tumeurs – notamment humaines [20, 66-69] – de *Salmonella* est connue depuis un demi-siècle [9].

*Salmonella Typhimurium* possède près de 200 gènes codant pour des facteurs de virulence. Ceux-ci sont répartis entre cinq îlots de pathogénicité principaux (pathogenicity islands : PAIs), plusieurs îlots de pathogénicité secondaires (pathogenicity islets), au moins un plasmide, en plus de différentes localisations chromosomiques [20, 70-78]. Les îlots de pathogénicité principaux codent pour un facteur de virulence particulier : les systèmes de sécrétion de type III. Ceux-ci possèdent un intérêt thérapeutique qui sera détaillé ultérieurement. L'un de ces systèmes est le Inv/Spa dont les gènes sont localisés à hauteur de *Salmonella* Pathogenicity Island-1 (SPI1), et est responsable de l'invasion épithéliale lors de la dissémination intestinale [20, 78-82]. Un second système d'expression de type III est localisé au niveau de *Salmonella* Pathogenicity Island-2 (SPI2), joue un rôle crucial dans la croissance systémique de *Salmonella* chez l'hôte, et est nécessaire à la survie intracellulaire dans les cellules épithéliales et les macrophages [20, 70-73, 78, 79, 83-87].

### 3. Genre *Clostridium* :

Le genre *Clostridium* est surtout connu pour ses espèces ubiquitaires particulièrement pathogènes pour l'Homme. Cependant, la majorité des bactéries de ce genre sont bénignes et tout aussi répandues que les premières [1].

Le genre *Clostridium*, proposé vers le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, appartient à la famille des Bacillaceae du phylum Firmicutes de Bacteria [88]. Il comprend plus de 200 espèces physiologiquement différentes organisées en au moins 12 lignées [88], constituant l'un des plus vaste genres procaryotes [1]. Ce sont des bacilles gram positif, anaérobies occasionnellement aérotolérants à métabolisme fermentatif, producteurs d'endospores [1], incapables de réduire les sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en sulfides ( $\text{S}^{2-}$ ) [88]. La vaste majorité se présente sous forme de bâtonnets mobiles par ciliature péritriche [88].

Les bactéries du genre *Clostridium* sont pléomorphes, leurs caractéristiques morphologiques variant grandement d'une souche à l'autre, d'une espèce à l'autre ou au sein de la même espèce. Mais en général, ce sont des organismes bacilliformes volumineux mesurant de 0.4 à 1.3  $\mu\text{m}$  de large et 3 à 8  $\mu\text{m}$  de long, retrouvés isolés ou organisés en paires ou en chaînes [88].

Les spores clostridiennes se forment lorsque la bactérie se retrouve en milieu hostile. Ce sont des structures spécialisées grandement résistantes à la chaleur, aux radiations, à la dessiccation et aux agressions chimiques. Elles sont plus larges que les formes végétatives, et peuvent se former à hauteur de différents points du bacille, conférant à celui-ci des aspects variables (Figure 4). Une fois constituées, les spores se détachent de la cellule mère, et leur

germination en formes végétatives se fait quand les conditions nutritionnelles et environnementales sont adéquates [88].

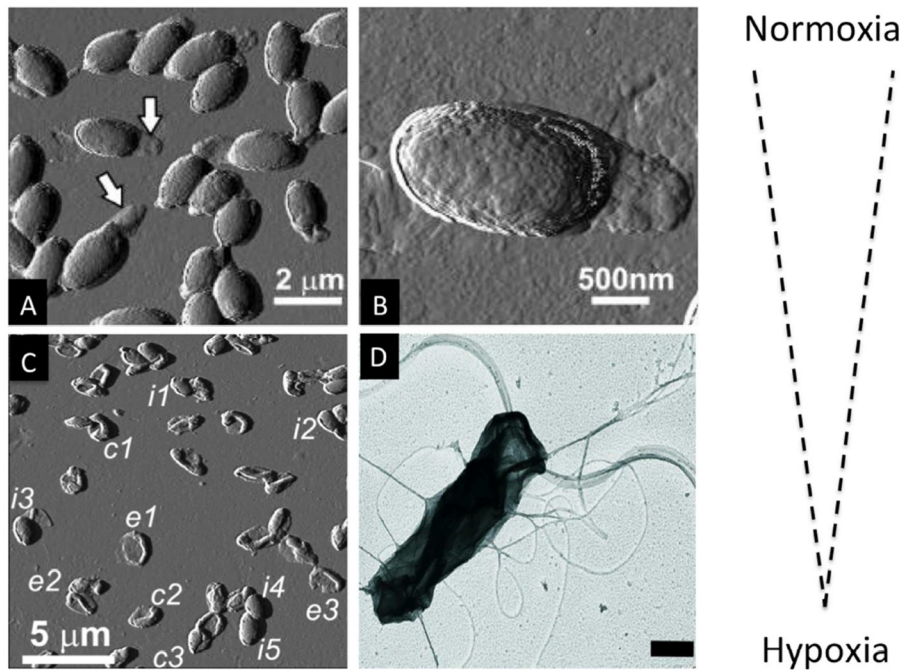
*Clostridium* prolifère essentiellement dans le sol, les sédiments d'eau et dans le tractus de nombreux animaux dont l'Homme ; Ainsi, *Clostridium perfringens* a été retrouvé dans presque tous les prélèvements de sol au niveau desquels il a été recherché, et près de 40 espèces ont été retrouvées dans les selles humaines, dont plusieurs pathogènes [88].

Les bactéries du genre *Clostridium* sont anaérobies, leur production énergétique ne nécessitant pas d'oxygène ; celle-ci provient de la fermentation de substrats de carbone et de nitrogène. Néanmoins la tolérance envers l'oxygène varie entre les différentes souches. Certaines, telles que *Clostridium novyi*, tolèrent de basses concentrations en oxygène, alors que pour d'autres l'oxygène est hautement toxique [88].

Les températures et pH nécessaires à la croissance des bactéries du genre *Clostridium* s'étalent sur une large palette. La majorité préfèrent des pH inclus entre 6 et 7 et des températures entre 27 et 37°C, mais certaines peuvent se multiplier à des pH inférieurs à 4 et supérieurs à 8, et des températures ne dépassant pas 10°C pour les souches les plus psychrophiles, et des températures au-delà de 60°C pour les thermophiles [88].

Les phages et les plasmides sont communs dans le genre *Clostridium*, et pour la plupart codent pour des fonctions encore méconnues. Cependant, il a été démontré que des phages codent pour des toxines, et que certains plasmides expriment des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [88].

L'étude génétique des bactéries du genre *Clostridium* en est encore à ses phases précoces. Cependant, des avancées importantes ont été réalisées. Les techniques de biologie moléculaire ont permis le développement d'outils génétiques tels que les vecteurs d'expression et de clonage, les techniques d'inactivation de gènes (gene knock-out systems), et les techniques de transfert de gènes par transformation ou conjugaison [88].



**Micrographs of *C. novyi*-NT spores and outgrowth.**

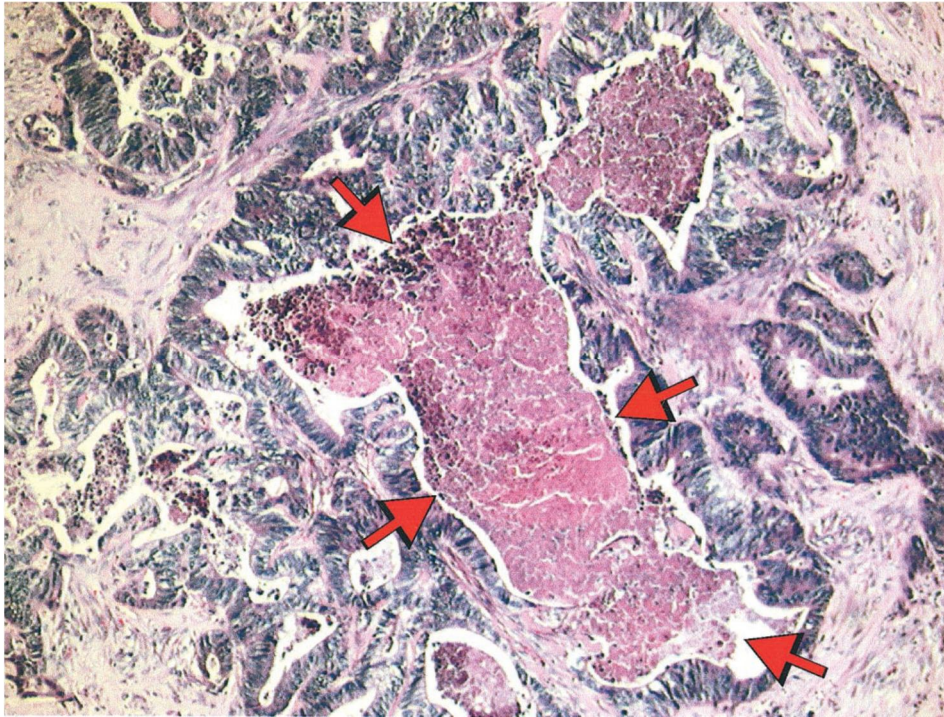
(A) Atomic force micrograph of air-dried *C. novyi*-NT spores. Some of the spores have a “tail” corresponding to the amorphous shell (arrow). (B) Magnification of a single *C. novyi*-NT spore highlighting the irregular spore surface and a “tail”. (C) Phase-contrast micrograph of spores exposed to germination medium for 24 hours. Depicted are spores that are fully intact (i1-i5), collapsed after germination (c1-c3), or fully outgrown only leaving an empty spore coat behind (e1-e3). (D) Electron micrograph of a vegetative *C. novyi*-NT with numerous flagella. (Bar = 0.5  $\mu$ m).

**Figure 4 :** *Clostridium novyi*-NT, forme sporulée et forme végétative [38].

## **B. Mécanismes d'action :**

### **1. Microenvironnement tumoral et hypoxie :**

Les tumeurs sont des structures complexes, composées de microenvironnements différents faisant l'hétérogénéité néoplasique caractéristique, qui constitue un obstacle thérapeutique conséquent [4, 58, 89]. Le microenvironnement hypoxique fait partie des microenvironnements les plus importants et les plus étudiés, et est lié aux tumeurs solides d'autant plus qu'elles sont agressives [4]. 80% des tumeurs malignes tombent dans la catégorie des cancers solides [1, 90], expliquant la récurrence importante de l'hypoxie en oncologie [1]. Ainsi, sur 20 métastases hépatiques d'un volume supérieur à 1 cm<sup>3</sup> sélectionnées au hasard, toutes contenaient des portions hypoxiques plus ou moins volumineuses constituant entre 25 et 75% des masses (Figure 5) [91].



Typical human colorectal metastases. Extensive areas of necrosis, such as one one indicated by arrows, are intermixed with areas of viable tumor cells. Similar large areas of necrosis were observed in each of the metastatic lesions from 20 different patients chosen at random from pathologic archives.

**Figure 5 :** Zone de nécrose (indiquée par les flèches) à l'intérieur d'une tumeur solide [91].

L'hypoxie tumorale est la conséquence du déséquilibre entre l'apport et la consommation d'oxygène par la cellule néoplasique [1] découlant de deux éléments essentiels ; d'une part l'asynchronisme de croissance des cellules endothéliales et des cellules malignes, la vitesse de croissance des cellules tumorales étant supérieure à celle des néo-vaisseaux [8], et d'autre part les anomalies architecturales du système vasculaire engendré [4].

En effet, la néovascularisation tumorale est stimulée par le VEGF (Vascular endothelial growth factor) produit par les cellules néoplasiques. Les cellules endothéliales naissant de cette manière ont une tendance particulière envers l'apoptose, induisant une apparition et une disparition cyclique des néo-vaisseaux. La vascularisation est ainsi immature et sujette à diverses anomalies structurales entravant la fluctuation normale du sang : shunts intravasculaires, embranchements, vaisseaux borgnes [8]. Ces éléments conduisent à une suppléance hétérogène en oxygène et en nutriments, avec des régions moins fournies que d'autres constituant des niches hypoxiques voire nécrotiques [1, 8].

La zone de transition est une région de quiescence cellulaire à la limite entre les zones nécrotiques et les zones oxygénées viables des tumeurs, possédant un index mitotique plus faible et une densité stromale moindre que ceux retrouvés dans le tissu tumoral viable [58, 92].

L'hypoxie est liée à un phénotype tumoral plus malin qui affecte la stabilité génomique, l'apoptose, l'angiogenèse et la survenue de métastases [93, 94].

Les anomalies vasculaires et l'environnement cellulaire dans ces zones génèrent une résistance vis-à-vis des thérapeutiques classiques [58, 95, 96].

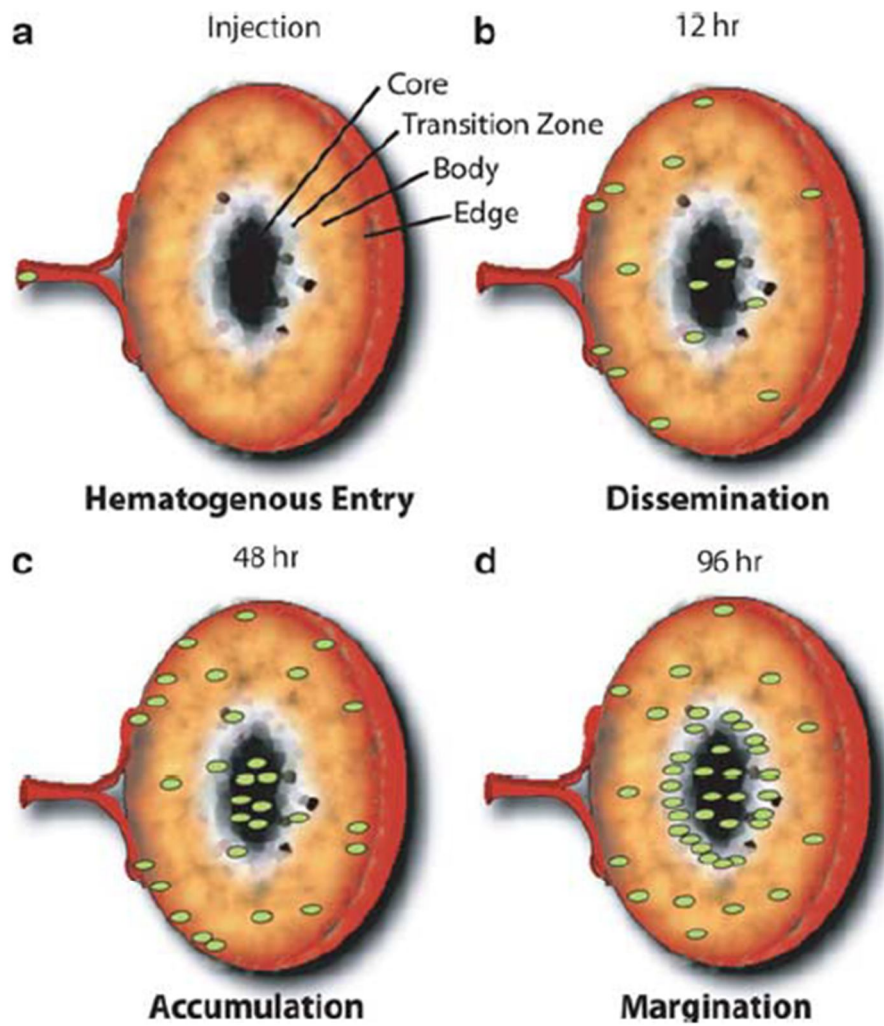
Dans ces régions les concentrations en oxygène sont parfois inférieures à 0.3% (<2.5mmHg). A ce niveau, les cellules néoplasiques sont trois fois plus résistantes aux radiations ionisantes par rapport aux cellules normalement oxygénées, l'efficacité de la thérapeutique étant dépendante de l'oxygénation [4]. Les zones hypoxiques sont également résistantes à de nombreuses chimiothérapies cytolytiques [1, 8, 97], conséquence du défaut de concentration de celles-ci induit par l'insuffisance de la vascularisation [1, 4, 58, 98].

L'hypoxie stimule également la progression maligne tumorale [57], augmentant l'agressivité et la capacité invasive tumorale [8]. Elle provoque la sélection de cellules résistantes à l'apoptose et déficientes en p53 – gène suppresseur de tumeurs – promouvant la prolifération des sous-populations cellulaires résistantes aux agents cytotoxiques [58, 93, 99, 100].

La maladie métastatique est responsable de 90% des décès liés au cancer. L'hypoxie favorise la propagation des métastases [8], et ce par divers mécanismes incluant l'angiogenèse anarchique, la stimulation de l'expression de gènes pro-métastatiques, ou encore le déclenchement de la mutation du gène p53 [1].

En somme, les régions hypoxiques grèvent le pronostic vital des patients [1, 101], stimulent la survenue de métastases, et sont relativement résistantes aux thérapeutiques classiques, et sont de plus très fréquentes [1, 4, 94, 102]. L'intérêt que peut susciter une thérapeutique ciblant particulièrement ces zones est donc évident. Ainsi, l'utilisation de bactéries anaérobies – pour lesquelles le micromilieu tumoral hypoxique constitue une niche environnementale propice au développement [1, 4, 9] (Figure 6) – pour le traitement de cancers solides semble être une solution idéale, ciblant une population cellulaire évasive,

métastatique et résistante aux thérapies habituelles [8]. Certaines bactéries permettent d'ailleurs de cibler spécifiquement la zone de transition, telles que l'*Escherichia coli* Nissle 1917 [58, 103, 104].



Model of *Salmonella* accumulation within tumor micro-environments. (a) Bacteria first access the tumor via hematogenous entry. (b) During the first 12 h bacteria disseminate throughout all microenvironment regions. (c) For first 48 h bacteria migrate and proliferate, resulting in accumulation within all regions. (d) By 96 h, bacteria marginate to the tumor transition zone and density decreases in other regions.

**Figure 6 :** Accumulation de *Salmonella* dans les régions hypoxiques du microenvironnement tumoral [58].

La grande complexité du microenvironnement tumoral, en fait le siège de multiples obstacles physiques et chimiques à la colonisation bactérienne [20]. Ainsi, le ciblage spécifique et effectif du tissu tumoral est une tâche rendue ardue par la désorganisation de la vascularisation et la pression hydrostatique interstitielle élevée caractérisant la néoplasie [4]. Egalement, de nombreux leucocytes – macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, et neutrophiles – subsistent dans ce milieu, et possèdent une activité antimicrobienne [20]. La capacité des bactéries à survivre et à se multiplier dans un tel milieu est vitale quant à leur utilisation en tant que vecteurs anti-tumoraux [20, 78].

## 2. Colonisation préférentielle du tissu néoplasique :

De nombreuses bactéries présentent la caractéristique de se développer quasi-exclusivement au niveau tumoral tout en épargnant les tissus sains, ce qui constitue l'un des points forts de la bactériothérapie oncolytique [4, 44]. Cela a été prouvé en 1955 par Malmgren et Flanigan pour le *Clostridium tetani* [9, 44], et dans les années 80 pour le *Bifidobacterium bifidum* [8] (Figure 3). De nombreuses autres bactéries ont été isolées autour et au niveau de tumeurs [105], et ont été testées quant à leur capacité de colonisation tumorale spécifique. Seules certaines présentaient une telle qualité [91] (Tableau II). Parmi celles-ci *Salmonella Typhimurium* [58, 106-109] ou encore *Escherichia coli* Nissle 1917 [58, 103, 104].

**Tableau II** : Bactéries ciblant et proliférant au niveau du tissu tumoral [3].

Bacteria home and replicate in tumor microenvironment.

---

Bifidobacteria

- B. adolescentis*
- B. animalis*
- B. bifidum*
- B. boum*
- B. breve*
- B. coryneforme*
- B. dentium*
- B. indicum*
- B. infantis*
- B. longum*
- B. magnum*
- B. pseudolongum*

Lactobacilli

- L. bifidus*
- L. delbrueckii*

Clostridia

- C. absonum*
- C. acetobutylicum*
- C. bifermentans*
- C. difficile*
- C. histolyticum*
- C. perfringens*
- C. novyi* – exhibited extensive spreading even in poorly-vascularized tumor areas
- C. sordellii* – exhibited extensive spreading even in poorly-vascularized tumor areas

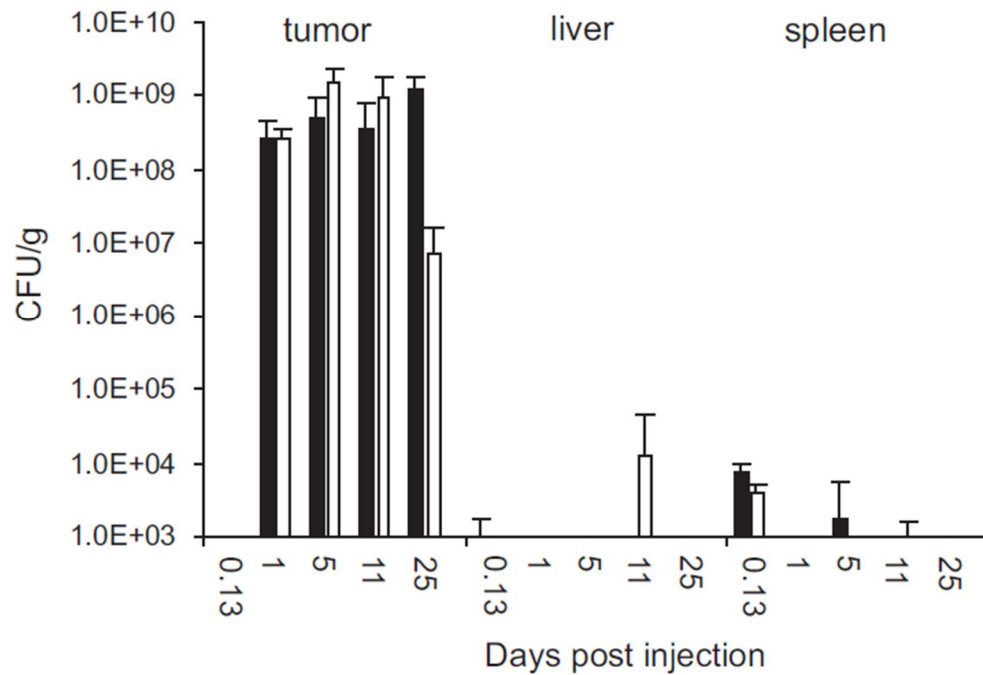
La colonisation préférentielle du tissu néoplasique par certaines bactéries reste à ce jour (2016) imparfaitement comprise, et serait consécutive aux caractéristiques du microenvironnement tumoral et aux propriétés bactériennes : la présence de nutriments particuliers au niveau tumoral [94], la protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte conférée par cet environnement, ainsi que les besoins en oxygène des bactéries, leur mode de survie intra ou extracellulaire, et leur motilité, sont autant d'éléments qui ont été évoqués pour expliquer le phénomène. Des mécanismes hémodynamiques [110] et chimiotactiques [111] seraient également impliqués [3].

- Vascularisation tumorale :

En effet, la néo-vascularisation tumorale de mauvaise qualité présente des malformations permettant l'accumulation bactérienne dans des culs-de-sac vasculaires isolés de la circulation normale. Elle est également caractérisée par une perméabilité anormale facilitant la pénétration des germes, qui vont alors diffuser au niveau du tissu tumoral pour se loger dans les zones nécrotiques et les zones de transition [58] qui leur confèrent un environnement favorable abrité du système immunitaire de l'hôte [4, 94, 103].

- Immunité intra-tumorale :

Le système immunitaire ne semble pas, en effet, affecter les bactéries logées au niveau tumoral. L'administration d'*Escherichia coli* Nissle 1917 chez la souris nude immunodéficiente et la souris BALB/c immunocompétente, toutes deux porteuses de tumeurs mammaires murines 4T1, conduit à une colonisation et une réplication bactériennes tumorales similaires pendant au moins 11 jours (Figure 7) [104].

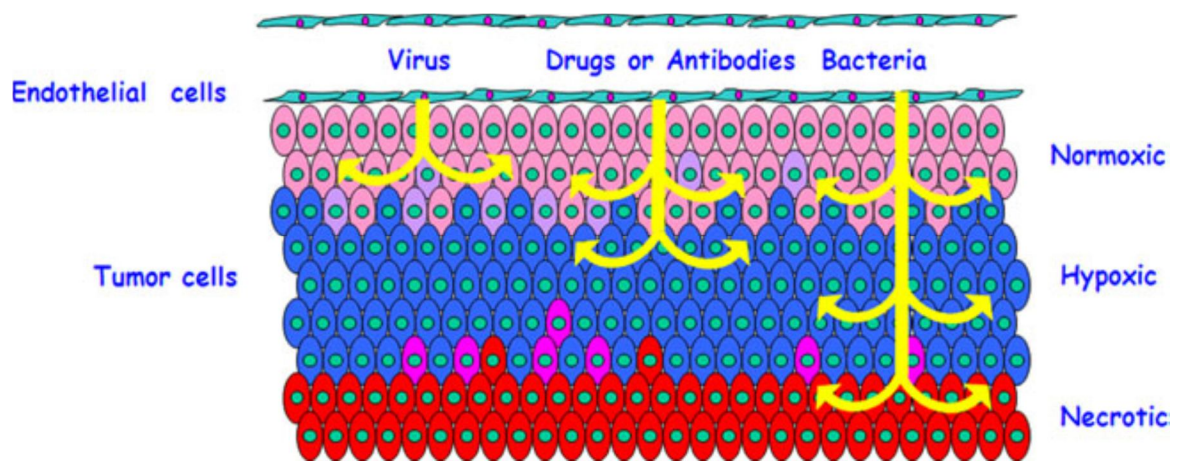


Bacterial colonization of 4T1 tumor-bearing nude mice (black bars) or BALB/c mice (white bars) at 3 h, 1, 5, 11, and 25 days post-bacterial injection ( $2 \times 10^6$  CFU in  $100 \mu\text{l}$ ). The average number of CFU/g tissue and standard deviation for four mice per group is shown.

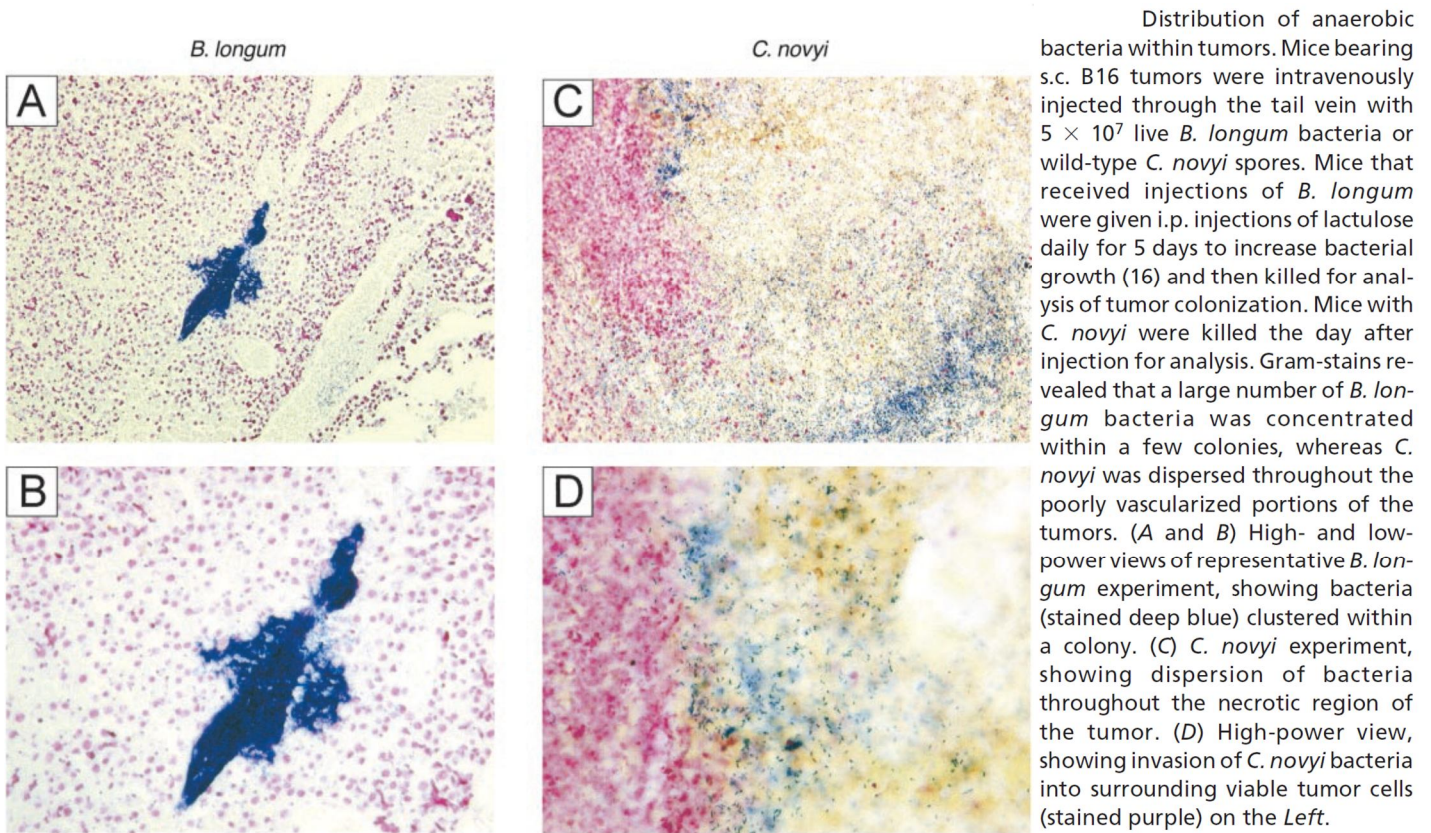
**Figure 7 :** Colonisation tumorale par *Escherichia coli* Nissle 1917 chez la souris immunodéficiente (colonnes noires) et la souris immunocompétente (colonnes blanches) [104].

- Mobilité bactérienne :

La mobilité des bactéries leur confère la capacité de se déplacer activement depuis le réseau vasculaire vers les régions hypoxiques puis nécrotiques, permettant d'atteindre des zones tissulaires inaccessibles à tout autre moyen thérapeutique (Figure 8) [4]. Ainsi, *Clostridium novyi* et *Clostridium sordellii* ont montré un effet anti-tumoral notoire lors d'une étude conduite par Vogelstein [91], grâce notamment à leur grande motilité permettant une diffusion intra-tumorale optimale [9]. Cela dit, toutes les bactéries permettant la colonisation tumorale spécifique ne sont pas obligatoirement mobiles [8], et inversement toutes les anaérobies mobiles ne présentent pas systématiquement de diffusion intra-néoplasique extensive [91] : ainsi, *Bifidobacterium longum*, malgré qu'il ne soit pas muni de flagelles, persiste et prolifère en région hypoxique tumorale (Figure 9) [8].



**Figure 8 :** Les bactéries permettent d’atteindre les zones hypoxiques et nécrotiques, inaccessibles aux autres thérapeutiques [4].



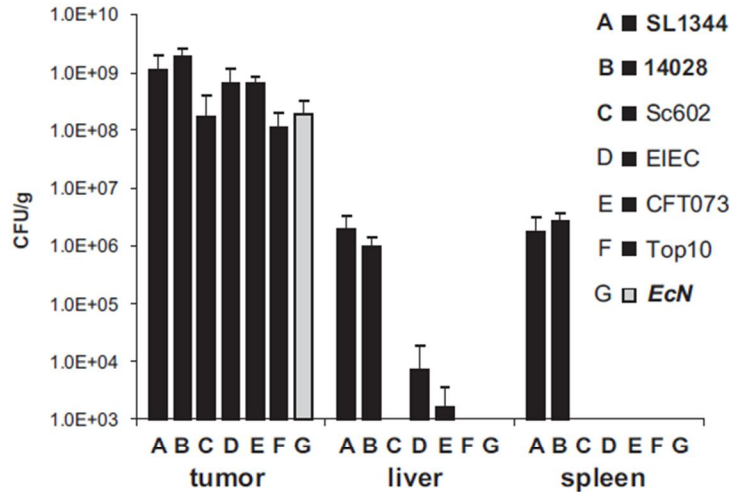
s.c. : sous-cutané ; C. : *Clostridium* ; B. : *Bifidobacterium* ; i.p : intra-péritonéal.

**Figure 9 :** Distribution de *Bifidobacterium longum* et de *Clostridium novyi* dans des mélanomes murins B16, vus en bleu. *Bifidobacterium* s'accumule en amas (A et B), alors que *Clostridium* diffuse plus uniformément (C et D) [91].

- Facteurs de virulence et pathogénicité :

Dans le cas d'*Escherichia coli*, la pathogénicité et les facteurs de virulence ne semblent pas influencer la colonisation tumorale, qui atteint les mêmes niveaux d'importance pour les souches pathogènes et non pathogènes. Cependant, les souches non pathogènes offrent la spécificité de la colonisation qui se limite à la néoplasie et n'atteint pas les tissus normaux : le foie et la rate restent exempts de présence bactérienne contrairement à la tumeur (Figure 10) [104].

Chez d'autres bactéries, certains facteurs de virulence jouent parfois un rôle notable dans le ciblage tumoral et la prolifération intra-néoplasique. Parmi ceux-ci, les facteurs exprimés par *Salmonella* Pathogenicity Island-2 (SPI2) de *Salmonella* (Tableau III) [20, 78].



Distribution and tumor colonization of pathogenic and non-pathogenic enterobacterial strains in syngeneic 4T1 tumor-bearing BALB/c mice. *S. typhimurium* SL1344 ( $1 \times 10^5$ ), *S. typhimurium* 14028 ( $3 \times 10^5$ ), *S. flexneri* SC602 ( $1 \times 10^5$ ), *E. coli* 4608-58 ( $2 \times 10^5$ ), *E. coli* CFT073 ( $2 \times 10^5$ ), *E. coli* Top10 ( $2 \times 10^5$ ), and *E. coli* Nissle 1917 ( $2 \times 10^5$ ) were i.v. injected into 4T1 tumor-bearing BALB/c mice (groups of 4 mice each). Two days later, excised tumors, livers, and spleens were homogenized and analyzed for the presence of bacteria. Shown is the average number of CFU/g tissue plus standard deviation.

*S. typhimurium* : *Salmonella typhimurium* ; *S. flexneri* : *Shigella flexneri* ;

*E. coli* : *Escherichia coli* ; EIEC : *Escherichia coli* 4608-58 ; CFU : Colony Forming Units.

**Figure 10 :** Colonisation tumorale, hépatique et splénique par différentes bactéries injectées chez la souris porteuse de tumeur. *Escherichia coli* Nissen 1917 (colonne G) est une souche non pathogène génétiquement très proche de la souche CFT073 uropathogène (colonne E) [112], et est également un probiotique [104, 113]. *Escherichia coli* Top10 (colonne F) est également non pathogène, incapable de métaboliser le galactose et le L-arabinose, et déficiente en la synthèse de leucine [78]. Les autres souches sont pathogènes [104].

**Tableau III :** Effet de la mutation en SPI1 et en SPI2 sur la colonisation des cellules tumorales [78].

Les souches mutées en SPI1 présentent une moindre colonisation des cellules tumorales par rapport à celles mutées en SPI2. Les souches mutées en SPI2 présentent une colonisation presque équivalente à celle des souches non mutées.

**Table 1** Effects of TTSS mutations in SPI-1 and SPI-2 on salmonellae invasion of Cloudman S91 mouse melanoma cells *in vitro*

Strain	cfu / 10 <sup>6</sup> melanoma cells / 15 min
YS1646	1.1 ± 0.1 × 10 <sup>5</sup>
1646 <i>prgH</i> <sup>-</sup>	4.2 ± 2.1 × 10 <sup>2</sup> *
1646 <i>ssaT</i> <sup>-</sup>	2.5 ± 0.6 × 10 <sup>4</sup>
YS7212	3.8 ± 0.3 × 10 <sup>5</sup>
7212 <i>prgH</i> <sup>-</sup>	5.0 ± 0.9 × 10 <sup>3</sup> *
7212 <i>ssaT</i> <sup>-</sup>	2.9 ± 0.1 × 10 <sup>5</sup>

Invasion was carried out for 15 minutes as described (Materials and methods). Results are the mean ± SE for triplicate determinations, and the experiments were performed three times with similar results.

\*Statistical differences *versus* parental strains ( $P < .010$ ).

YS1646 et YS7212 : Souches atténuées de Salmonella ;

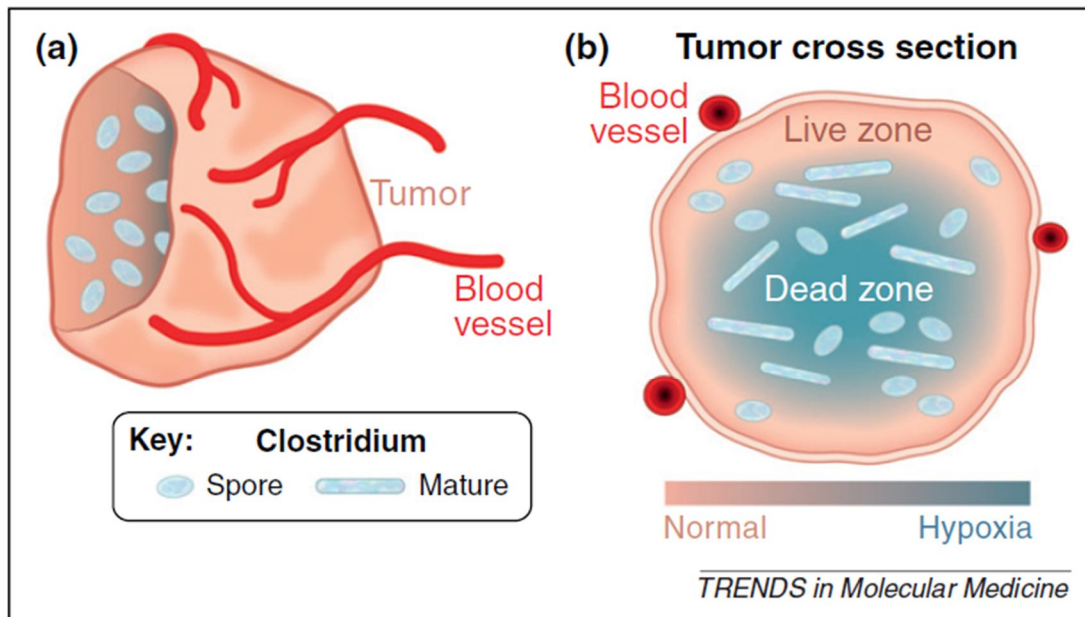
1646 et 7212 : Souches YS1646 et YS7212 respectivement, mutées en SPI1 (*prgH*<sup>-</sup>) ou en SPI2 (*ssaT*<sup>-</sup>).

±SE : Standard Error.

- Oxygénation et anaérobiose :

Il a été démontré que la colonisation spécifique des tumeurs par *Salmonella typhimurium* est dépendante de la présence de nécrose et de microenvironnements quiescents [58, 111]. En effet, l'oxygénation des cellules tumorales vivantes limite l'importance de l'accumulation de *Salmonella* au niveau de leur cytoplasme, alors qu'au niveau des cellules nécrotiques la bactérie est retrouvée en grandes quantités [4]. Des données similaires ont été relevées pour *Clostridium sordellii* et *Clostridium novyi*, anaérobies extrêmement sensibles à l'oxygène, qui ne colonisent que les tissus tumoraux qui présentent des zones d'hypoxie et de nécrose (Figure 11) [9]. Ces données soulignent le rôle de l'hypoxie dans l'induction de la localisation spécifique des bactéries au niveau néoplasique.

Ainsi, les anaérobies strictes et facultatives à développement intra ou extracellulaire offrent d'excellents résultats dans le sens d'une colonisation tumorale préférentielle [3]. Cela serait justement inhérent à leur capacité de survie en milieu hypoxique [4, 8] et à leur forte sensibilité à l'oxygène conduisant à une circonscription de leur croissance aux régions hypoxiques [9].



Treatment of tumours with Clostridial spores. Injected spores penetrate tumour tissue (a), and preferentially germinate and proliferate in the hypoxic core, killing tumour cells (b).

**Figure 11 :** Prolifération préférentielle de *Clostridium* dans les régions hypoxiques des tumeurs solides [114].

- Chimiotactisme :

L'accumulation préférentielle au niveau des régions de quiescence serait également dépendante de récepteurs chimiotactiques [3, 58, 115, 116] sensibles pour des molécules libérées par les cellules tumorales mourantes de la bordure nécrotique [58, 111]. La migration bactérienne est aussi liée au gradient intratumoral de molécules de petite taille telles que l'aspartate, la serine et le ribose, notamment en ce qui concerne *Salmonella Typhimurium* [58, 116]. Ce gradient permet à *Salmonella* de s'accumuler dans des tumeurs de taille inférieure à 300  $\mu\text{m}$  *in vitro* [58, 111], ce qui est excellent pour le ciblage des métastases.

### 3. Mécanismes de l'oncolyse :

La bactériothérapie oncolytique est basée sur l'utilisation de bactéries capables d'induire la destruction des cellules néoplasiques. Cette capacité oncolytique, démontrée pour la première fois par Parker pour le genre *Clostridium* [42], nécessiterait le caractère anaérobie comme prérequis selon Möse [9, 20, 117]. Toutefois, les caractères sporifère et anaérobie conférant la spécificité envers le tissu hypoxique sont insuffisants à l'induction de la lyse tumorale : *Bacillus mesentericus* et *Bacillus subtilis*, bactéries sporifères induisant la colonisation tumorale spécifique n'induisent pas d'oncolyse associée [4, 9, 117]. Il a donc été conclu que d'autres facteurs étaient impliqués [20].

Les mécanismes par lesquels les bactéries induisent la destruction tumorale sont encore mal cernés, et impliqueraient différents mécanismes [4,

118] dont la destruction cellulaire directe et l'activation du système immunitaire [3, 4, 38].

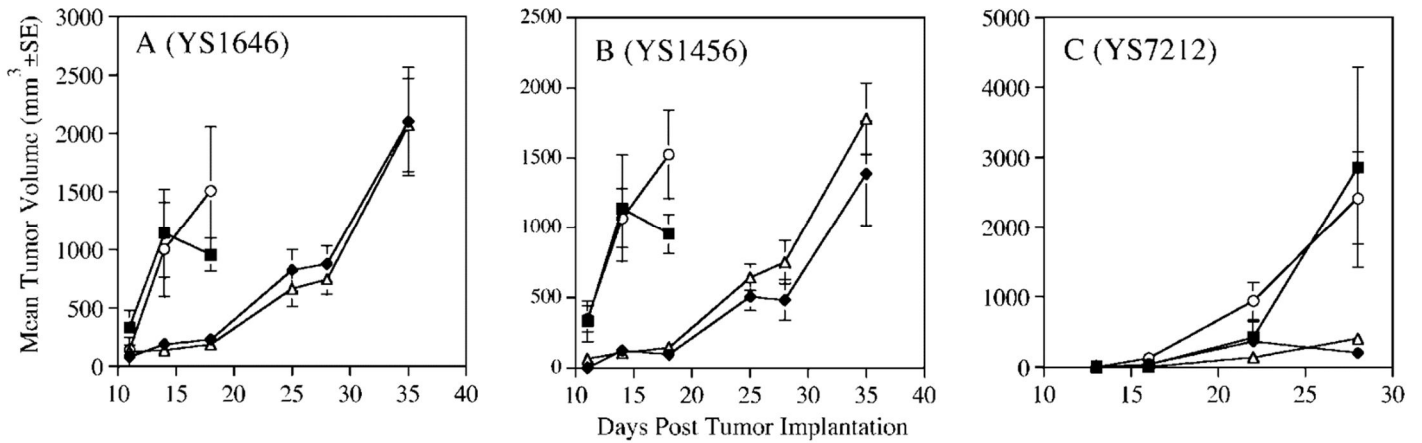
**a) Mécanismes immuno-indépendants :**

Les bactéries provoquent l'apoptose des cellules néoplasiques proportionnellement à leur accumulation intra-tumorale [4, 58, 94]. De nombreux mécanismes immuno-indépendants ont été évoqués pour expliquer cet effet oncolytique, parmi lesquels la compétition pour les nutriments entre les cellules néoplasiques et les bactéries [58, 119].

L'autophagie est un mécanisme cellulaire par lequel se fait l'élimination des protéines vieillissantes et des organites qui n'ont plus d'utilité pour la cellule. Ce mécanisme est moins actif au niveau des cellules tumorales, et moins réactif au stress. La colonisation bactérienne semble stimuler l'autophagie par des voies d'activation encore mal comprises [4].

Les facteurs de virulence des bactéries jouent un rôle important quant à leurs capacités oncolytiques. Les facteurs exprimés par *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI2) chez *Salmonella* sont responsables de la croissance bactérienne systémique et de la survie intracellulaire dans les macrophages et les cellules épithéliales, et sont indispensables à l'activité anti-tumorale [20, 83-87] ; l'administration de souches SPI2- (dont le gène *ssaT* est inactivé) chez la souris ne conduit à aucune activité anti-tumorale, contrairement à celles SPI2+ [20]. Ces facteurs seraient impliqués dans le ciblage et la multiplication intra-tumorale [20, 78].

Cependant, tous les facteurs de virulence ne possèdent pas le même poids pour ce qui est de l'activité anti-néoplasique. Ainsi, l'inactivation de *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1) (par inactivation du gène *prgH*) de *Salmonella* conduit certes à une réduction de la capacité invasive de celle-ci *in vitro* de 100 fois, mais conserve la capacité d'inhibition de la croissance tumorale de la souche *in vivo* (Figure 12) [20].



Effects of mutations in the TTSS of SPI-1 (*prgH*<sup>-</sup>) and SPI-2 (*ssaT*<sup>-</sup>) on tumor growth suppression by salmonellae strains YS1646 (upper), YS1456 (middle), and YS7212 (lower). Salmonellae ( $2 \times 10^5$  cfu/mouse) were injected i.v. into C57B6 mice 7 days post s.c. implantation of B16F10 melanoma cells and tumor growth was monitored with electronic calipers. Points represent mean  $\pm$  SE for  $n=8-10$  mice/group. Data were not shown if two or more animals in a group had died. **Panel A:** YS1646. **Panel B:** YS1456. **Panel C:** YS7212. Untreated controls: squares,

SPI-1<sup>+</sup>; SPI-2<sup>+</sup> strains, diamonds; *prgH*<sup>-</sup> (SPI-1), triangles; *ssaT*<sup>-</sup> (SPI-2), circles. Similar results were obtained in three separate experiments. SPI-1 mutant strains (*prgH*<sup>-</sup>), like their wild-type counterparts, were significantly different from saline-injected controls in tumor growth suppression ( $P < .070$ ), while SPI-2 mutants (*ssaT*<sup>-</sup>) showed no significant differences from saline controls ( $P > .600$ ). Data for statistical analyses were taken from tumor measurements on day 18 (YS1646, YS1456) or 24 (YS7212) post tumor implantation.

Carrés : Animaux de contrôle ; Diamants : SPI1+, SPI2+ ; Triangles : SPI1- ; Cercles : SPI2-.

**Figure 12 :** Effets de la mutation en SPI1 et en SPI2 sur l'inhibition de la croissance tumorale [78].

*Salmonella* s'engage dans des échanges biochimiques complexes avec les cellules hôtes tumorales [120, 121], résultant en une stimulation de systèmes de sécrétion protéique bactérienne [122, 123] dont le système de sécrétion de type III (Type Three Secretion System : TTSS), codé au niveau du centisome 63 du chromosome de la bactérie [120]. Les protéines produites déclenchent des voies de transduction de signal au niveau des cellules tumorales, ce qui a comme conséquence le réarrangement du cytosquelette permettant l'internalisation des bactéries et l'initiation de réponses nucléaires induisant la production de cytokines pro-inflammatoires [120, 124].

*Salmonella* entraîne la mort des cellules infectées [125-127] par le biais du lipopolysaccharide (LPS) – responsable de l'apoptose des cellules tumorales et endothéliales [4, 94, 128] – et par induction des voies de transduction des signaux apoptotiques (Apoptotic signal transduction pathways) [58].

Le *Bifidobacterium* permet la conversion du lactose administré par voie générale en lactate à hauteur du tissu tumoral spécifiquement colonisé. L'accumulation de lactate ainsi produit, associée à d'autres procédés, permet de diminuer le pH des cellules néoplasiques, altérant des processus métaboliques vitaux ce qui se solde somme toute par la lyse cellulaire [129, 130].

Le *Clostridium novyi-NT* exprime des protéines extracellulaires jouant un rôle dans la destruction des cellules néoplasiques. Les plus importantes de celles-ci sont la phospholipase C (NT01CX0979) et deux autres lipases (NT01CX2047 et NT01CX0630) qui altèrent la structure des bicouches lipidiques des cellules tumorales, modifient leur perméabilité membranaire et ainsi provoquent une cytotoxicité directe [38, 131]. En parallèle, les

phospholipases activent la réaction inflammatoire, ce qui stimule l'immunité anti-tumorale [38, 131].

### **b) Rôle du système immunitaire :**

#### **○ Tumeur et immunité :**

Les cellules cancéreuses possèdent la propriété d'inhiber la réaction immunitaire et d'échapper à ses effets par le biais de mécanismes multiples : elles peuvent limiter leur présentation d'antigènes du fait d'une présentation restreinte ou d'une maturation inadéquate des cellules présentatrices d'antigènes, exprimer des ligands tels que le Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) qui inhibe la fonction des cellules immunitaires une fois fixé sur ses récepteurs, produire des cytokines immunosuppressives telles que le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'Interleukine 10 (IL10), et stimuler des cellules de régulation immune négative telles que les cellules T régulatrices (regulatory T cells : Treg) et les cellules suppressives d'origine myéloïde (Myeloid-Derived Suppressor Cells : MDSC) [38, 132-136].

Les conséquences de la réaction immunitaire naturellement engagée envers la prolifération néoplasique sont complexes, voire paradoxales ; bien qu'induisant la destruction des cellules tumorales, elle promeut la progression tumorale et la sélection de cellules tumorales agressives immuno-résistantes [4].

Cependant, un puissant stimulus activant l'immunité permettrait le contrôle de certaines voies d'échappement immunitaire tumoral par le recrutement de cellules immunocompétentes et la sécrétion de cytokines, comme

cela se voit avec les virus oncolytiques [38, 137, 138], et pourrait entraîner la destruction du phénotype immunosuppresseur [4].

○ **Bactério-oncolyse et immunité :**

L'immunité naturelle et acquise jouent un rôle dans l'activité bactériooncolytique [4, 20, 58, 139, 140]. Plusieurs observations semblent soutenir cette hypothèse. En effet, l'oncolyse obtenue par administration de *Clostridium novyi-NT* sur modèle murin induit le développement d'une résistance spécifique vis-à-vis de la tumeur utilisée, non étendue à d'autres types tumoraux [3, 8, 38, 141, 142]. Egalement, la réduction tumorale se poursuit après l'élimination des bactéries utilisées pour le traitement de tumeurs murines [142, 143] – ce qui implique l'intervention d'une autre entité à activité anti-tumorale – et s'accompagne du développement d'une immunisation contre les antigènes néoplasiques spécifiques [143]. L'étude immuno-histochimique de tumeurs de souris traitées par *Salmonella choleraesuis* montre un infiltrat important de cellules immunocompétentes, fait essentiellement de LT CD8 et de neutrophiles [94]. D'autre part, une expérience fut tentée pour confirmer l'intervention du système immunitaire : des souris BALB/c furent injectées par un mélange constitué par les cellules du mélanome murin B16F10 associées aux toxines B CT26 traitées de *Clostridium difficile*. Le résultat obtenu fut l'immunisation spécifique et durable des souris contre le mélanome, confirmant l'implication du système immunitaire dans l'oncolyse médiée par les bactéries [38, 144].

Les bactéries et adjuvants bactériens ont prouvé leur capacité à stimuler le système immunitaire des patients porteurs de cancers [145-147] et à amplifier la

réaction immune anti-tumorale [54, 143, 148]. La réplication bactérienne, la lyse des cellules néoplasiques, la libération d'antigènes tumoraux et de cytokines, et l'inflammation provoquée au niveau tumoral recrutent les cellules immunocompétentes et induisent un infiltrat important de celles-ci dans le tissu tumoral. Ceci a pour conséquence une augmentation de la destruction néoplasique par l'effet oncolytique propre des cellules immunitaires [4] et par un freinage des mécanismes d'échappement immunitaire néoplasiques [38]. Les cellules immunitaires impliquées dans cette réaction sont nombreuses, et incluent les lymphocytes T CD4 et T CD8, les lymphocytes NK (Natural Killers), les neutrophiles et les cellules dendritiques [149].

Les bactéries, telles que *Clostridium novyi-NT*, induisent ce phénomène de recrutement immunitaire par la réponse inflammatoire importante qu'elles provoquent au niveau tumoral, impliquant des cytokines pro-inflammatoires diverses telles que l'interleukine-6 (IL6), le Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), la Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2), le Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP-1). Cela conduit à une réponse immunitaire adaptative générant une immunité anti-tumorale durable [38, 141, 142].

Les bactéries gram négatif telles que *Salmonella* induisent la libération importante de Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) du fait de l'expression à leur surface du lipopolysaccharide (LPS) hautement immunogène, initiant ainsi une cascade de réactions médiées par diverses cytokines se terminant par la destruction des cellules néoplasiques [20, 150]. Dans le cadre de ce processus, deux voies de signalisation immunitaire liées aux bactéries sont activées : Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) et Damage-Associated

Molecular Pattern (DAMP), et promeuvent la maturation des cellules présentatrices. Ces dernières, en association avec des cytokines, stimulent l'activation des LT CD4 et LT CD8 [3, 4] pour une action immunitaire spécifique envers les cellules néoplasiques [38, 151, 152]. Les LT CD4 ainsi activés entraînent la mort des cellules tumorales par le phénomène de la mort cellulaire immunogénique (Immunogenic Cell Death) [38, 153-155]. Les LT CD4 avec les macrophages sont également responsables d'une libération importante d'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) [4], qui permet le recrutement des cellules NK vers le foyer tumoral [143, 156].

Un autre mécanisme dirigeant l'activité immunitaire vers la tumeur, est l'expression des antigènes bactériens par les cellules tumorales infectées. Ainsi, les cellules tumorales colonisées par *Salmonella Typhimurium* présentent les antigènes de la bactérie, ce qui en fait la cible des lymphocytes T spécifiquement dirigés contre *Salmonella*. Cette propriété des cellules néoplasiques à signaler leur état « infecté » peut être exploitée afin de générer une régression tumorale complète [157] : Une immunisation préalable des souris porteuses de tumeurs contre *Salmonella* permet d'augmenter l'effet anti-tumoral de l'injection de la bactérie ; le taux de rémission complète passe de 20% à 50% à l'adjonction de la vaccination [157].

L'intervention du système immunitaire permet d'optimiser l'activité bactérienne anti-tumorale locale [4, 94, 158-160]. Elle permet également d'obtenir une activité anti-tumorale à distance : l'immunité ainsi stimulée pourra agir sur les tumeurs situées à distance, des métastases en l'occurrence, non colonisées par la bactérie [38].

Certains agents adjuvants immunostimulants tels que la curcumine et le diguanylate cyclique peuvent en principe améliorer cette optimisation [38, 151, 152].

# **| APPROCHE THERAPEUTIQUE ANTINEOPLASIQUE**

## **IV. APPROCHE THERAPEUTIQUE ANTINEOPLASIQUE :**

### **A. La thérapie antinéoplasique à l'ère pré- bactériothérapique :**

#### **1. Thérapie antinéoplasique conventionnelle :**

La chirurgie présente les meilleures qualités en termes de cytoréduction, lorsque l'état du patient le permet en l'absence de métastases. Les progrès techniques et technologiques permettent une chirurgie plus conservatrice et moins invasive que jamais, profitant à la qualité de vie post-opératoire [8].

La radiothérapie constitue un traitement local, tout comme la chirurgie, mais reste limitée par la radiorésistance tumorale et les dommages infligés aux tissus normaux adjacents [8].

Le caractère spatialement limité de ces approches thérapeutiques, bien qu'avantageux dans les formes localisées, implique l'inefficacité dans les formes disséminées métastatiques. Ces situations imposent un traitement systémique tel que la chimiothérapie ou l'immunothérapie [8].

Le principe de la chimiothérapie est basé sur le caractère rapidement prolifératif du tissu néoplasique. De ce fait, les cellules épithéliales du tractus digestif et les progéniteurs hématopoïétiques possédant un cycle cellulaire plus rapide que celui tumoral, présentent une vulnérabilité importante aux agents chimiothérapeutiques. La destruction provoquée à leur niveau nuit à la qualité de vie et, surtout, impose la limitation des doses administrées [8].

## 2. Thérapies ciblées : Molecular Targeted Therapies

Dans l'optique de la réduction des effets indésirables secondaires à la destruction des cellules saines causée par des thérapeutiques conventionnelles peu spécifiques, se fit l'orientation vers des approches ciblant les spécificités moléculaires des cellules néoplasiques [161-163]. Différents types d'agents ont été utilisés à cet effet [8]:

- Composés moléculaires de petite taille inhibiteurs d'enzymes à activité associée à la malignité, tels que l'*Imatinib* [164] approuvé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique, ou le *Lapatinib* approuvé pour le ciblage du Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2), protéine dont la surexpression joue un rôle dans le développement et la progression de certaines formes agressives de cancer du sein [8, 165].
- Anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines membranaires régulant la prolifération cellulaire peuvent être utilisés pour inhiber les signaux de croissance ou induire la cytotoxicité. Le *Trastuzumab* [166], dirigé contre la protéine HER2 est utilisé dans les formes métastatiques de cancer du sein exprimant cette protéine. Le *Rituximab* [167] est utilisé chez les patients porteurs de lymphome folliculaire. Le *Cetuximab* [168] et le *Panitumumab* sont utilisés dans les formes métastatiques de cancer colorectal [169].
- Small Interfering RNA (SiRNA) – qui permettent l'inhibition de l'expression de gènes par dégradation de l'ARN messenger après la

transcription – pourraient être utilisés, mais les vecteurs nécessaires n'ont pas encore vu le jour [170].

- Peptides perméables [171] causant l'apoptose, la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire [8].

Un autre concept de traitement spécifique consiste en la vaccination antinéoplasique par l'administration d'oncoantigènes stimulant le système immunitaire de l'hôte [172-174]. Les résultats sont peu probants jusqu'à présent, mais de nombreux essais cliniques sont toujours en cours à travers le monde [8].

Malgré les progrès effectués en thérapie spécifique, l'hétérogénéité des cellules néoplasiques représente toujours un obstacle face à la cytoréduction complète [8].

### **3. Vecteurs inertes de thérapie anticancéreuse : Drug delivery systems for cancer therapy**

En thérapie classique, la drogue administrée par voie générale est rapidement métabolisée par le foie puis éliminée par le rein, exposant le tissu tumoral à de trop faibles doses sur une durée insuffisante, tout en exposant le tissu normal à des doses trop importantes sur une durée trop longue. Une thérapie efficace devrait maintenir une concentration suffisante sur une durée prolongée au niveau tumoral, en limitant au maximum la dose et la durée d'exposition du tissu normal [8].

Un des systèmes de d'acheminement (drug delivery system) repose sur les macromolécules dont la taille inférieure à 100 nm doit permettre l'extravasation à partir du système sanguin vers le tissu tumoral [175].

Un système d'acheminement efficace malgré l'hétérogénéité tumorale reste cependant à développer [8].

Un autre obstacle à la cytoréduction complète est la présence de zones d'anaérobiose au niveau des tumeurs solides [8].

#### **4. Mise à profit de l'hypoxie tumorale :**

Les conditions anaérobiques présentant un obstacle majeur à la thérapie disponible, elles furent rapidement le centre d'intérêt de multiples études visant à explorer les possibilités thérapeutiques potentielles qu'elles pourraient offrir. Ainsi naquit, entre autres [176, 177], l'idée du ciblage spécifique de ces zones par le biais d'agents bactériens [8].

#### **5. Cellules souches tumorales :**

Le concept de l'existence de cellules souches tumorales qui seraient à l'origine des populations cellulaires hétérogènes, est un concept récent qui suggère que la destruction de celles-ci serait suffisante pour obtenir la guérison [8].

Dans ce sens, des efforts ont été déployés afin de cibler spécifiquement ce contingent cellulaire au niveau moléculaire. Cela dit, la faisabilité d'un tel ciblage est encore douteuse : la spécificité moléculaire permet-elle réellement de discriminer entre cellules souches tumorales et cellules souches normales ? Le concept est-il applicable à tout type de cancer [8] ?

## **B. Stratégies conceptionnelles bactério-oncolytiques :**

Les bactéries constituent un agent anti-tumoral puissant du fait de leur capacité de ciblage tumoral spécifique, leur pouvoir oncolytique, et leur potentiel en tant que vecteurs géniques [4].

### **1. Amélioration de la tolérance :**

L'une des premières qualités que devrait présenter une bactérie destinée à la thérapie anti-tumorale est la pathogénicité minimale envers l'hôte [3]. Cependant, il est rare qu'une souche entièrement non pathogène puisse produire un effet oncolytique quelconque. Certaines permettent une colonisation tumorale spécifique, mais n'engendrent aucun effet anti-tumoral, par opposition à nombre de souches pathogènes. Celles-ci puisent leur pouvoir oncolytique dans leurs capacités pathogènes. Cependant, la toxicité produite va le plus souvent au-delà de ce qui peut être toléré par un organisme vivant, induisant fréquemment le décès malgré le contrôle tumoral réalisé. Cela va donc à l'encontre du but recherché par la bactériothérapie oncolytique, qui n'est pas tant de détruire la tumeur à tout prix, mais d'améliorer la survie des patients autant que possible. Un exemple de cette situation est celui de *Clostridium novyi* et de *Clostridium sordellii* qui, malgré la colonisation tumorale optimale et la destruction qu'ils y engendrent, provoquent le décès de toutes les souris traitées dans les 16 à 18h suivant l'injection, probablement du fait de toxines létales libérées par les bactéries [91, 178-182]. Un autre mécanisme responsable de toxicité souvent létale est le syndrome de lyse secondaire à la destruction extensive de la tumeur par les germes [9].

Cette situation montre clairement la dépendance de l'efficacité antinéoplasique envers la pathogénicité bactérienne, et cristallise le dilemme entre les deux faits. Une réduction de la toxicité est nécessaire pour l'obtention de souches tolérables, mais une réduction trop importante ou mal conduite lèse l'efficacité antinéoplasique.

- Utilisation de souches naturellement non-pathogènes :

Une des approches conduites pour résoudre le problème fut le screening pour des souches non pathogènes qui permettraient la colonisation tumorale spécifique et qui possèderaient éventuellement une activité anti-néoplasique.

Parmi celles-ci, la souche M-55 du *Clostridium sporogenes*, dont la non-pathogénicité fut initialement mise en évidence par Möse et Möse qui font preuve d'une grande confiance en leur trouvaille doublée d'un grand zèle, qui les pousse à s'administrer à eux-mêmes les spores du germe à des doses comprises entre  $10^6$  et  $10^{10}$  CFU (Colony Forming Units) afin de prouver son inoffensivité [9, 44]. Ce résultat fut ultérieurement confirmé par des expériences conduites sur l'Homme par l'administration de doses similaires, qui ne révélèrent aucun effet indésirable mise à part, dans certains cas, une fébricule inconséquente [9, 44].

Aussi fut-il démontré que bien que les formes végétatives des bactéries soient toxiques lorsqu'administrées par voie veineuse, les formes sporulées sont inoffensives pour les animaux normaux. Ainsi, l'administration intraveineuse de quantité importantes de spores de *Clostridium novyi* et de *Clostridium sordellii*

atteignant  $10^8$  CFU chez des souris normales n'engendre aucun effet secondaire notable [91].

Une autre bactérie naturellement non-pathogène possédant des propriétés de ciblage tumoral spécifique est le *Bifidobacterium*. Connue comme telle et utilisée depuis des années en tant que probiotique et pour la fermentation des produits laitiers, son inoffensivité a été prouvée par diverses études conduites sur l'animal, notamment la souris et le macaque crabier [8]. Des tests anaphylactiques ont également été conduits chez les cochons d'inde, réputés pour leur haute sensibilité aux antigènes, et n'ont montré aucun effet secondaire sérieux (Tableau IV). En effet, la faible induction de production de cytokines pro-inflammatoires par les différentes souches de *Bifidobacterium* a été rapportée initialement pour l'IL-12 (Interleukine 12) et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) [183], puis confirmée pour d'autres cytokines lors d'une étude comparative entre *Bifidobacterium* et *Escherichia coli* (Figure 13), démontrant l'incapacité de la bactérie à induire la septicémie [8].

**Tableau IV** : Symptômes anaphylactiques chez le cochon d'inde après administration de *Bifidobacterium longum* [8].

Table 1. Anaphylaxis symptoms<sup>(58)</sup> of actively immunized guinea pigs injected i.v. with cytosine deaminase of *Escherichia coli* (e-CD)-transformed *Bifidobacterium longum* (*B. longum*/e-CD) or OVA 14 days after final sensitization.

Group	Sensitized antigen	Cause antigen	No. of animals	Antigen challenge outcome				
				(-)	(+/-)	(+)	(++)	(+++)
A	<i>B. longum</i> /e-CD	<i>B. longum</i> /e-CD	5	4	1	0	0	0
B	<i>B. longum</i> /e-CD + FCA	<i>B. longum</i> /e-CD	5	5	0	0	0	0
C	OVA + FCA	OVA	5	0	0	5	5	4
D	Saline + FCA	<i>B. longum</i> /e-CD	5	5	0	0	0	0

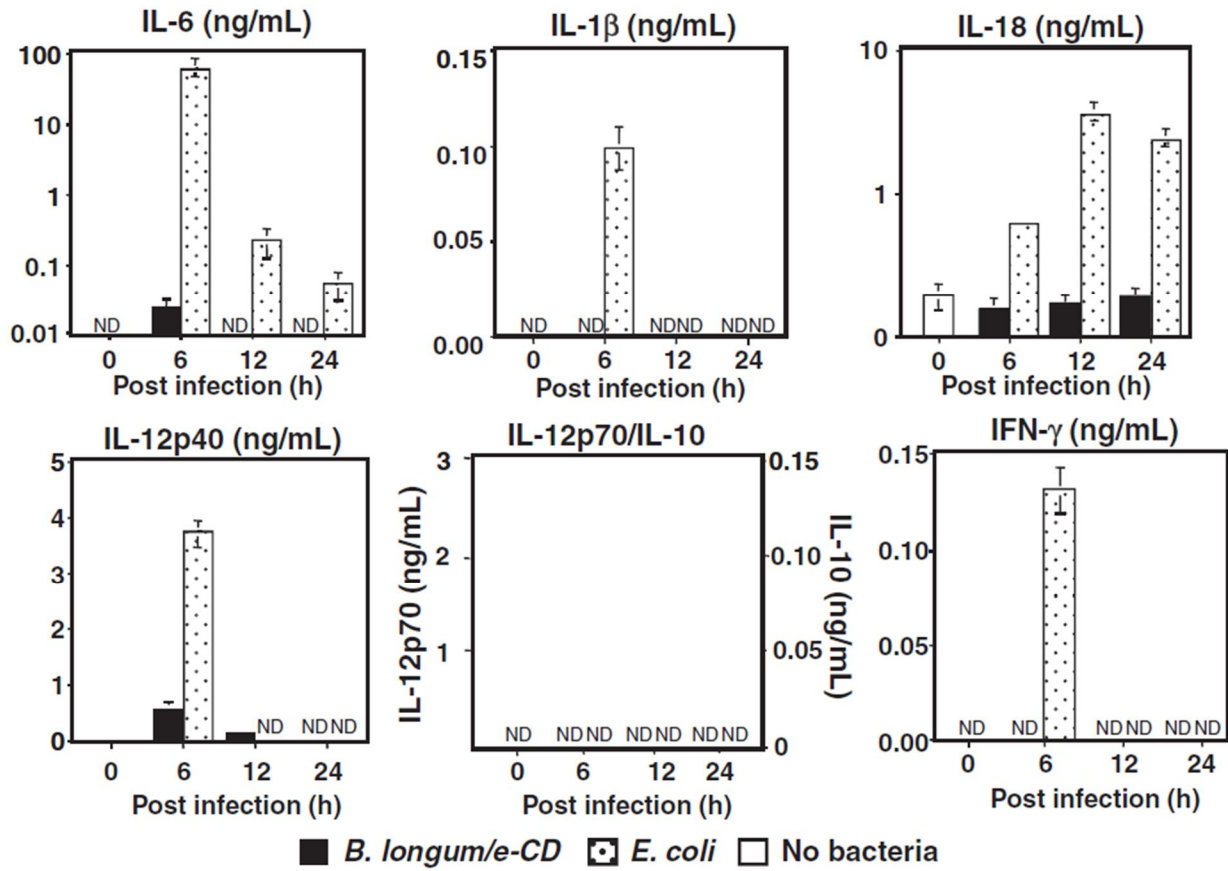
Anaphylaxis symptoms were quantified by the following criteria: -, no symptoms; +/-, scrub of face or ear and/or scratch of nose; +, coughing or locomotion ataxia; ++, convulsion or roll; but no death observed within 1 h; and +++, death observed within 1 h. FCA, Freund's complete adjuvant; OVA, ovalbumine.

e-CD : *Escherichia coli* cytosine déaminase.

FCA : Frunds complete adjuvant.

*B. longum* : *Bifidobacterium longum*.

OVA : Ovalbumine.



Production of inflammatory cytokines in C57BL/6 mice injected i.v. with cytosine deaminase of *Escherichia coli* (e-CD)-transformed *Bifidobacterium longum* (*B. longum*/e-CD) or non-pathogenic *E. coli* (control). Cytokines were assessed with ELISA 6 h after injection. Closed bars, blood of mice injected with *B. longum*/e-CD; dotted bars, blood of mice injected with non-pathogenic *E. coli*; open bars, normal blood. IFN, interferon; IL, interleukin; ND, not detected.

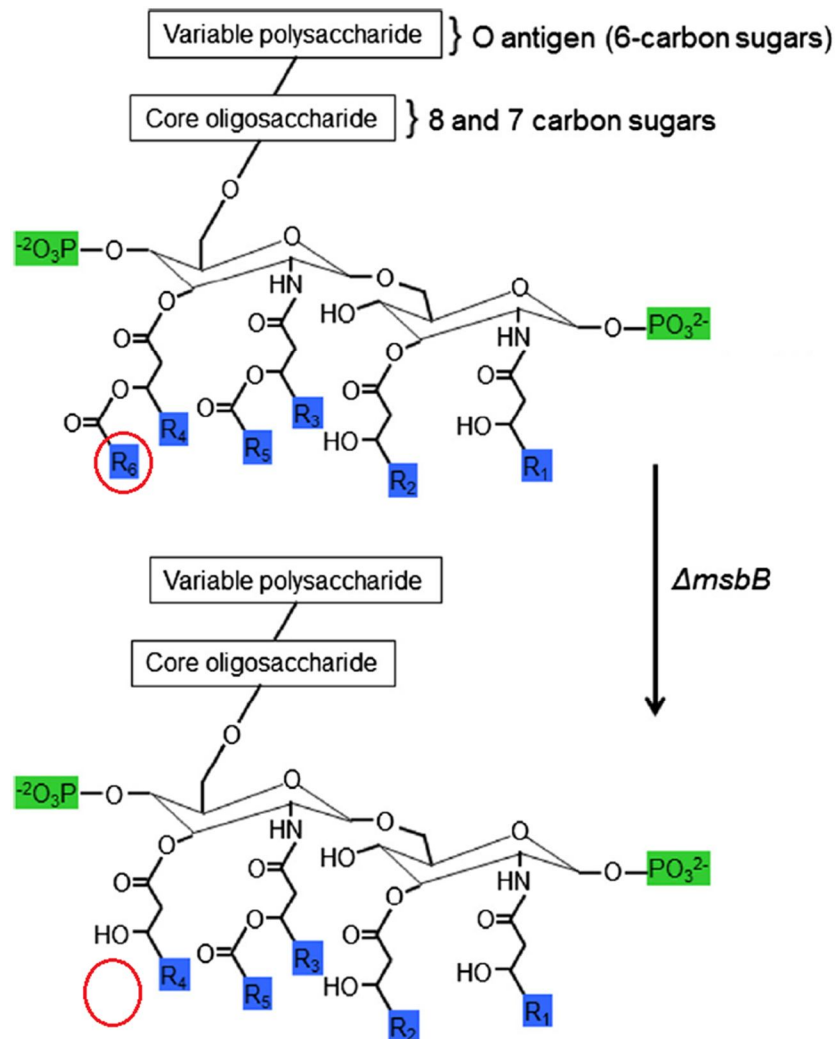
**Figure 13** : Production de cytokines inflammatoires chez la souris après injection de *Bifidobacterium longum* et d'*Escherichia coli* non pathogène [8].

- Inactivation par la chaleur :

La technique initialement utilisée pour limiter l'effet toxique des souches pathogènes fut l'inactivation par la chaleur, utilisée notamment par Coley lors de ses premières expérimentations avec *Streptococcus pyogenes* [9, 34]. Par la suite, le développement du champ du génie génétique a ouvert la voie à d'autres approches plus pointilleuses.

- Altération du lipopolysaccharide (LPS) immunogène :

L'administration des souches sauvages de bactéries à gram négatif est problématique du fait de leur tendance à l'induction de choc septique médié par TNF- $\alpha$  [20, 184, 185], dont la production importante est conséquence de l'expression à la surface de ces germes d'un lipopolysaccharide (LPS) hautement immunogène [9] impliqué dans les capacités de colonisation et d'infection [3]. La forte mortalité de ces bactéries liée au LPS est bien illustrée par l'administration intraveineuse d'*Escherichia Coli* Nissen 1917, pourtant non pathogène, qui conduit au décès de 40% des souris traitées [104]. Des modifications génétiques spécifiques basées sur l'inactivation du gène *msbB* – responsable de la myristoylation du lipide A [186] – ont permis de réduire grandement la capacité d'induction de TNF- $\alpha$  de *Salmonella* et d'*Escherichia coli* (Figure 14) [9, 20].



Structures of gram-negative bacterial LPS grown in vitro. LPS is a conjugate of 3-hydroxy fatty acids with a glucosamine disaccharide bearing diametrically-placed phosphate residues. R1 to R4 represent the 11-carbon portion of myristoyl acid (C14:0). In *Salmonella*, R5, R6 and R7 represent the 11-, 13- and 15-carbon portion of lauric (C12:0), myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids, respectively. The hexa-acylated LPS containing 12–14 carbons in each chain is a potent activator of human TLR4. Deviations from this structure is not recognized by the human immune system. In *S. Typhimurium* ( $\Delta$ msbB, VNP20009), LPS lacks the acyl chain (R6).

**Figure 14 :** Structure du LPS sauvage et du LPS de *Salmonella Typhimurium* VNP20009  $\Delta$ msbB (*msbB*<sup>-</sup>). Ce dernier se différencie du premier par la perte de la chaîne acyle R6 [3].

L'opération conduite sur *Escherichia coli* résulte en une mutation stable inconditionnelle, permettant une induction de TNF- $\alpha$  10 fois plus faible pour l'utilisation de bactéries entières, 10 000 fois plus faible pour l'utilisation du lipopolysaccharide purifié [20, 187, 188].

L'inactivation du gène *msbB* chez *Salmonella* entraîne un profil toxique similaire [20, 189]. Cependant, la souche résultante présente des anomalies de croissance mises en évidence dans certaines conditions *in vitro*, anomalies non retrouvées chez *Escherichia coli* [20, 190]. D'autre part, des mutations secondaires surviennent fréquemment – notamment chez la souche VNP20009 [3] – induisant une inactivation partielle du phénotype *msbB*<sup>-</sup>, et donc en une réversion vers des souches plus toxiques [20, 191]. L'adjonction ciblée de loci supplémentaires altérés permet d'empêcher la survenue de ce phénomène [3].

Des dosages de TNF- $\alpha$  ont été réalisés chez la souris et le porc 1.5 heures après l'administration de *Salmonella msbB*<sup>-</sup> et de *Salmonella msbB*<sup>+</sup>. Les résultats montrent clairement la faible induction de TNF- $\alpha$  par la souche *msbB*<sup>-</sup>, ne dépassant pas 33% des taux produits par la souche sauvage chez la souris, et 14% des taux produits par celle-ci chez le porc (Tableau V) [20].

**Tableau V** : Induction de TNF- $\alpha$  par *Salmonella msbB+* et *msbB-* chez la souris et le porc [20].

Host	<i>Salmonella</i> strain	TNF $\alpha$ (pg/mL serum)*	p
Mouse	Wild-type ( <i>msbB+</i> )	2122 (+632)	0.0072
	YS8211 ( <i>msbB-</i> )	691 (+196)	
Pig	Wild-type ( <i>msbB+</i> )	3494 (+2499)	0.0067
	YS1629 ( <i>msbB-</i> )	493 (+300)	

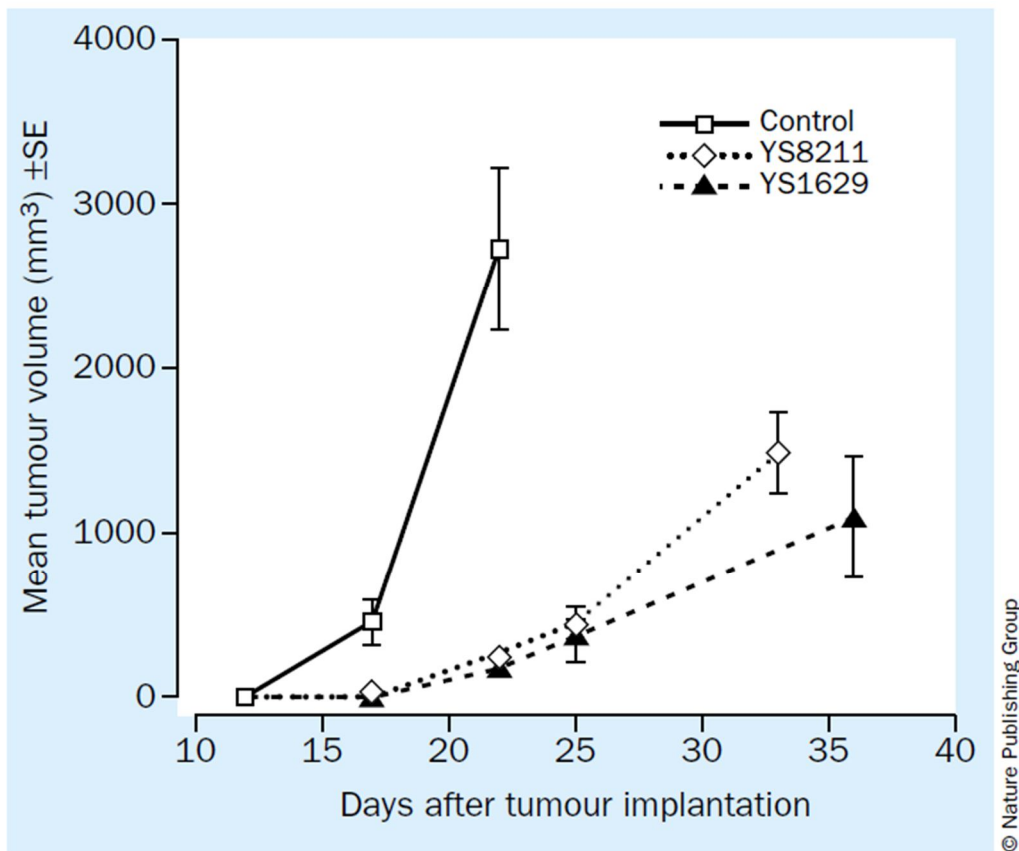
\*Circulating TNF $\alpha$  concentrations were measured 1.5 h after intravenous injection of bacteria.

p : Probabilité d'erreur.

Cette réduction d'induction de TNF- $\alpha$  s'accompagne d'une diminution de la virulence démontrée *in vivo*. L'administration intra-péritonéale de  $2.10^7$  CFU de *Salmonella msbB-* chez les souris n'induit qu'une mortalité négligeable avec survie de toutes les souris au-delà de 28 jours, alors que l'injection de  $2.10$  CFU de la souche sauvage suffit à provoquer le décès. De façon similaire, l'injection de *Salmonella msbB-* au niveau de la veine de l'oreille du porc n'induit pas de mortalité avec survie des cobayes plus de 28 jours, contre une létalité de 90% à 5 jours pour la souche sauvage [20].

Malgré la réduction importante de la toxicité des souches *msbB-*, celles-ci retiennent parfaitement leurs capacités anti-tumorales. L'administration de  $10^5$  CFU de *Salmonella msbB-* chez la souris porteuse de mélanome B16F10 conduit au bout de 5 jours à une colonisation tumorale à hauteur de  $10^8$  à  $10^9$  CFU/g de tissu avec un ratio tumeur pour foie de 1000:1 à 2000:1, associée à une inhibition de la croissance tumorale de 94 à 96% à 18 jours par rapport à la tumeur de contrôle (Figure 15), ce qui rejoint les chiffres obtenus par l'utilisation des souches *msbB+* [20].

L'une des souches *msbB-*, la VNP20009, est en cours d'étude dans le cadre d'essais cliniques phase I [3, 192-194], avec des premiers rapports montrant une dose tolérée de  $3.10^8$  CFU/m<sup>2</sup> et un ciblage tumoral spécifique chez certains patients [20, 139, 192].



*Tumour growth retardation of subcutaneously implanted B16F10 melanomas in C57B6 mice by *msbB*- Salmonella. Mice received either no bacteria or *msbB*- strains YS8211 or YS1629.*

**Figure 15 :** Inhibition de la croissance tumorale par les souches *msbB*- chez la souris [20].

- Production de souches auxotrophes :

La modification génétique de *Salmonella Typhimurium* par délétion du gène *purI*, obtenue par stimulation de la mutagenèse par nitrosoguanidine puis par isolation [186], produit une souche auxotrophe nécessitant un apport exogène d'adénine pour sa survie [9]. Le caractère auxotrophe fragilise la bactérie en général et la rend plus susceptible à l'action du système immunitaire de l'hôte [186]. D'autre part, purines, pyrimidines et acides aminés sont disponibles en quantités abondantes au niveau des tissus tumoraux siège de multiplication cellulaire active et de zones nécrotiques, constituant un réservoir adéquat pour les bactéries auxotrophes [186]. Cette altération a ainsi permis la réduction de la virulence mise en évidence sur modèle murin, tout en maintenant la spécificité du ciblage et la prolifération intra-tumorale [186].

- Altération de gènes nécessaires à la survie :

Une autre stratégie consiste en l'inhibition de gènes essentiels à la survie de la bactérie dans certains milieux. Le régulon PhoP est nécessaire à *Salmonella Typhimurium* quant à sa pathogénicité et sa survie dans les macrophages [65, 195, 196]. Il est composé des gènes régulateurs *phoP* – codant pour un régulateur transcriptionnel – et *phoQ* – codant pour un capteur d'environnement – et des gènes régulés par ceux-ci : *pagC* et *pagD* codant pour des protéines nécessaires à la survie dans les macrophages, *prgH* codant pour une protéine permettant l'invasion des cellules épithéliales, et d'autres : *phoN*, *prgA-D*... [65, 195, 197-199]. Des mutations à hauteur de *phoP*, *phoQ*, *pagC*, *pagD* ou *prgH* réduisent la virulence de *Salmonella Typhimurium* chez les souris

BALB/c [65, 195, 197]. Des souches mutantes pour *phoP*, *phoQ*, *pagC*, *pagD* présentent une survie réduite en milieu de culture de macrophages [195]. La mutation constitutive de *phoP*, responsable du phénotype PhoP<sup>c</sup>, réduit grandement la virulence de la bactérie ainsi que sa capacité de survie à l'intérieur des macrophages [65, 199]. L'association d'une mutation de *prgH* à celle de *phoP* produit une souche encore moins virulente [65]. Une des souches de *Salmonella Typhimurium* déficiente en *pho* est la souche LH430 [3].

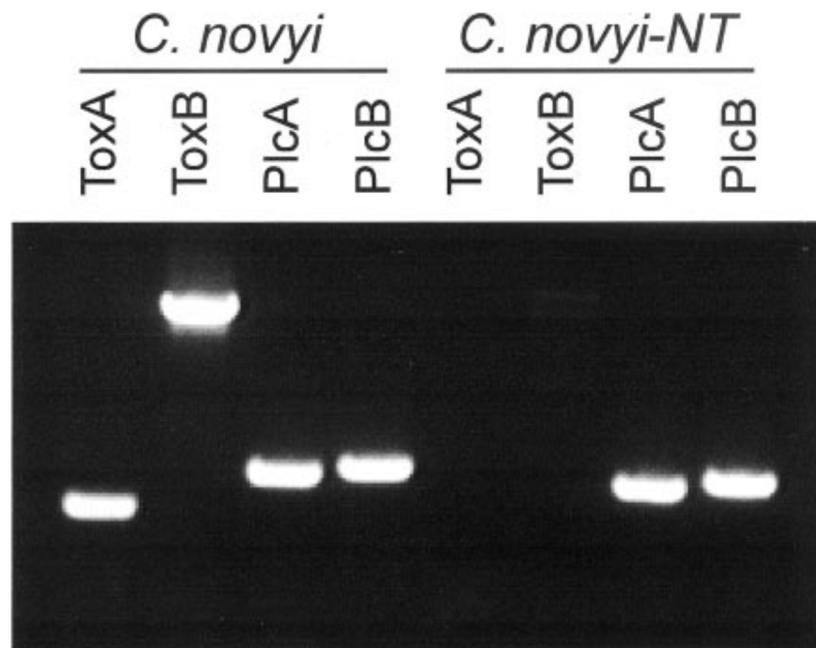
Cependant, la mutation des gènes régulateurs présente l'inconvénient d'ouvrir la voie à une possible mutation des facteurs de virulence vers une forme non régulée. Ainsi, la délétion des gènes de virulence eux-mêmes serait plus sûre [65].

- Altération des facteurs de virulence :

*Salmonella Typhimurium* possède de nombreux facteurs de virulence dont des systèmes de sécrétion de type III situés en *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1) et en *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI2) [79, 80, 83-87]. L'inactivation de SPI1 réduit la capacité d'invasion de 100 fois *in vitro*, tout en maintenant les capacités d'inhibition de la croissance tumorale *in vivo*. Par contre, l'inactivation de SPI2 conduit à une réduction de la multiplication bactérienne intra-tumorale avec disparition de l'effet anti-tumoral [20]. L'inefficacité anti-néoplasique des souches SPI2- ne semble pas découler de l'augmentation de leur susceptibilité à l'action du système immunitaire ; l'administration de souches SPI2- chez des souris à macrophages et à neutrophiles déficients ne produit pas d'effet sur la croissance tumorale [20].

Cependant, les mécanismes exacts restent inconnus, tout autant que ceux impliqués dans l'effet anti-tumoral de *Salmonella* [20].

Le *Clostridium novyi* produit une colonisation tumorale importante et sélective et une oncolyse remarquable. Cela dit, il est responsable d'une haute toxicité, induisant le décès de plus du tiers des souris traitées [91]. Le gène codant pour la toxine létale  $\alpha$  est localisé sur un phage et a pu, par conséquent, être éliminé par simple chauffage, produisant ainsi une souche non pathogène dénommée le *Clostridium novyi-NT* (Figure 16) [9, 142, 200].



Elimination of the lethal toxin gene from *C. novyi*. Following heat shock, PCR was performed on DNA from colonies to identify those which had lost the lethal toxin gene on the phage episome. Agarose gel electrophoresis of the PCR products with two independent primer sets (ToxA and ToxB) shows results from a *C. novyi* clone (*C. novyi-NT*) that had lost the gene and another clone (indicated as "*C. novyi*") that retained the gene. Controls were provided by primer sets (PlcA and PlcB) specific for the *C. novyi* phospholipase C gene demonstrating the integrity of the DNA templates in all reactions.

C. : Clostridium.

**Figure 16** : Electrophorèse des produits de PCR montrant l'élimination du gène de la toxine létale de *Clostridium novyi* [91].

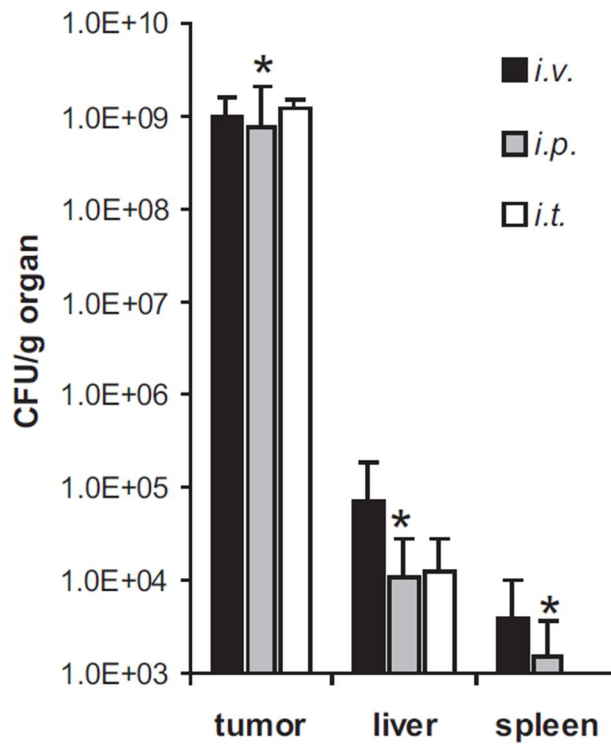
## 2. Voies d'administration :

La voie d'administration influe la colonisation tumorale par les bactéries [4, 201] et l'importance de la toxicité induite [38, 202].

L'administration intra-tumorale de *Salmonella* est plus efficace que l'administration par voie veineuse [38, 141, 203]. En effet la voie systémique nécessite l'administration de quantités importantes de bactéries pour que seule une fraction de celles-ci arrive réellement au niveau néoplasique [38, 204], augmentant ainsi le risque de survenue d'effets indésirables notamment chez les êtres à volume sanguin conséquent dont l'Homme [38]. Par opposition, la voie intra-tumorale permet de délivrer directement les bactéries au niveau néoplasique. L'administration intra-péritonéale conduit à une colonisation tumorale moins importante que celle induite par la voie intraveineuse [201]. Cette dernière permet une diffusion systémique des bactéries, et donc le ciblage de tumeurs à localisations multiples. Cependant, l'administration intra-tumorale a également permis la colonisation de tumeurs situées à distance de celles traitées [4, 94]. Enfin, l'administration orale réduit la toxicité tout en maintenant un effet anti-tumoral [4, 202], bien qu'une dose de germes supérieures soit nécessaire pour l'obtention d'une efficacité égale à celle obtenue par l'administration systémique [202].

Aucune différence majeure en termes de concentrations bactériennes intra-tumorales n'a cependant été notée pour l'administration de la même dose de bactéries selon les différentes voies (Figure 17) [104]. Une augmentation minime de la présence bactérienne dans le foie et la rate a été rapportée pour la voie veineuse [104]. L'administration intra-péritonéale est responsable d'une toxicité supérieure [202], et a provoqué le décès de 2 des 5 souris traitées par

*Escherichia coli* Nissle 1917, probablement du fait d'un choc septique induit par le lipopolysaccharide (LPS) du germe [104].



*EcN* ( $5 \times 10^6$  CFU) were injected into 4T1 tumor-bearing BALB/c mice via i.v., i.p., or i.t. administration. Three days p.i. bacterial load in tumors, livers, and spleens was determined. \*indicates that two out of five mice died after i.p. injection (those are not included in the chart).

*i.v.* : administration intraveineuse.

*i.t.* : administration intra-tumorale.

*i.p.* : administration intra-péritonéale.

*EcN* : *Escherichia coli* Nissen 1917.

**Figure 17** : Colonisation des différents tissus suite à l'administration d'*Escherichia coli* Nissle 1917 par différentes voies [104].

### 3. Oncolyse bactérienne directe :

Suite aux premières observations évoquant l'effet anti-tumoral de l'infection bactérienne, les premières tentatives thérapeutiques utilisant les bactéries visèrent à reproduire un tel effet de façon contrôlée. Cela commence par W. Busch qui tente de contaminer ses patients par l'agent causal de l'érysipèle, inconnu à l'époque, par le contact avec la literie contaminée des patients atteints de l'infection. Il arrive à obtenir l'oncolyse tumorale, mais au prix d'une toxicité létale. Par la suite, les agents infectieux seront injectés directement aux patients, d'abord vivants [21] puis atténués pour diminuer les effets toxiques. Les résultats obtenus furent qualitativement variables, et bien que prometteurs, furent dans l'ensemble plutôt décevants.

L'injection intra-tumorale des spores de *Clostridium histolyticum* chez la souris porteuse de sarcomes implantés et de cancers avancés produit l'oncolyse et le contrôle tumoral avec régression de la masse néoplasique [1, 2, 9, 20, 42, 45]. Cependant, la toxicité importante accompagnant l'oncolyse clostridienne engendre le décès de la majorité des animaux traités [20, 44, 46-50].

Le *Clostridium butyricum* M-55 non pathogène produit une lyse extensive des carcinomes d'Ehrlich entre autres cancers transplantés chez la souris, le rat et le lapin après inoculation intraveineuse [9, 47, 205], mais avec une persistance tissulaire périphérique tumorale mise histologiquement en évidence [20]. Cependant, l'oncolyse extensive engendrée conduit dans la presque totalité des cas au décès des animaux traités [20, 47].

La même bactérie administrée par voie veineuse à des patients porteurs de tumeurs malignes avancées – carcinome sinusien, mélanome, leiomyosarcome

abdominal, nodules neuro-sarcomateux, carcinome épidermoïde du sinus ethmoïdal – produit une lyse tumorale, mais ne conduit à l'amélioration clinique que chez un seul patient, sans aucune réponse complète retrouvée [38, 44].

Une approche visant à améliorer l'effet oncolytique de *Clostridium oncolyticum* M-55 fut la réduction de la concentration en oxygène de l'air respiré par l'animal porteur de la tumeur à 11-12%. Les résultats montrèrent une oncolyse microscopiquement complète, ainsi qu'une guérison complète dans 30% des cas [206]. L'utilisation clinique de ces stratégies n'a cependant pas produit les résultats escomptés [9].

L'injection de *Clostridium butyricum* M-55 par voie carotidienne chez 49 patients conduit à la liquéfaction quasi-totale de glioblastomes et à la constitution d'abcès cérébraux nécessitant l'intervention chirurgicale, et ce au bout d'une semaine après l'administration. Aucune amélioration des taux de récurrence et de survie ne fut relevée [9, 38, 115, 207].

*Clostridium novyi* et *Clostridium sordellii* ont montré un effet oncolytique important, avec une spécificité importante de la colonisation envers le tissu néoplasique, et une excellente diffusion intra-tumorale lors de leur administration intraveineuse chez des souris porteuses de cancer du côlon HCT116 et de mélanome B16 implantés en sous-cutané [91]. Cependant, l'effet anti-tumoral notable s'est vu grevé par l'importante toxicité secondaire à la production de la toxine  $\alpha$  responsable du décès de plus d'un tiers des souris testées dans les 16 à 18 heures suivant l'administration des spores [9].

L'administration du *Clostridium novyi-NT*, souche atténuée du *Clostridium novyi*, engendre une oncolyse et un freinage de la croissance

tumorale. Mais l'utilisation de celui-ci seul ne produit pas de contrôle tumoral satisfaisant [9, 142, 200].

Dans une autre étude, l'administration systémique de spores de *Clostridium novyi-NT* produit une germination exclusive à hauteur des régions tumorales hypoxiques, conduisant à la guérison chez 30% des souris traitées, malgré la persistance initiale de la périphérie tumorale mieux oxygénée. Le mécanisme de l'oncolyse implique l'intervention du système immunitaire, prouvée par l'immunisation développée envers la tumeur suite au traitement. La réponse immunitaire induite par le *Clostridium novyi-NT* associée à son effet oncolytique propre pourrait permettre la destruction de tumeurs volumineuses. Des essais cliniques concernant cette technique sont en cours [8, 9].

Des études ultérieures ont permis l'établissement des conditions optimales à l'oncolyse clostridienne : un volume tumoral de 3 cm<sup>2</sup> correspondant à 2g de tissu tumoral, une dose administrée de spores située entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>9</sup> CFU, et la voie d'administration intraveineuse ou intra-tumorale [9, 46, 49, 50, 208].

Au cours des études concernant le genre *Clostridium*, malgré l'importante oncolyse, la guérison après injection unique a été difficile à obtenir. Encore plus, l'oncolyse extensive a été le plus souvent mal tolérée et a conduit au décès de la majorité des animaux [9]. D'autre part, des différences importantes ont été notées quant à la qualité de la réponse entre les différents modèles animaux : les tumeurs de la souris apparaissant plus susceptibles que celles du rat et du lapin [46, 48-50, 208].

Les souches atténuées de *Salmonella* ont permis de retarder la croissance de nombreuses tumeurs humaines et murines implantées chez la souris, une inhibition perdurant de longues périodes, allant jusqu'à plusieurs semaines après le décès des souris de contrôle n'ayant pas bénéficié du traitement [20].

En 1997, Pawelek démontre pour la première fois le potentiel en thérapie anticancéreuse de la souche atténuée de *Salmonella typhimurium* par délétion de gène *msbB* et *purI* (VNP20009) : l'administration de la bactérie chez la souris porteuse de mélanome permet la colonisation tumorale préférentielle [186]. En outre, L'activité anti-tumorale inhérente à la souche a été démontrée sur de nombreux modèles tumoraux [9].

*Salmonella msbB-*, conduit à la colonisation tumorale spécifique associée à une inhibition de la croissance tumorale similaire à celle obtenue par l'utilisation des souches *msbB+*, malgré la réduction importante de la toxicité des souches *msbB-* par modification du lipide A [20].

*Salmonella* VNP20009 administrée par voie systémique a permis l'inhibition de la croissance de mélanomes murins B16F10 implantés en sous-cutané, ainsi que de tumeurs humaines greffées [209], et a également permis l'inhibition de métastases de cancer pulmonaire et de micro-métastases de mélanome chez la souris [20, 209].

L'administration intra-tumorale a aussi démontré son efficacité, *Salmonella typhimurium* atténuée induisant une régression tumorale complète des mélanomes B16F10, avec absence de récurrence dans 60% des cas [54, 157].

L'injection de souches auxotrophes de *Salmonella*, telles que *Salmonella Typhimurium A1* qui nécessite l'apport de leucine et d'arginine [9, 117], chez la souris conduit à une répllication préférentielle au niveau tumoral aboutissant à un ratio tissu tumoral pour tissu sain allant de 250:1 à 1000:1 [20, 186], accompagnée d'une régression tumorale [9, 117] ou d'une inhibition de la croissance persistant pendant plusieurs semaines [4].

*Salmonella choleraesuis* atténuée produit une colonisation préférentielle du tissu tumoral et une multiplication à son niveau résultant en des ratios dépassant 1000-10000:1 par rapport au tissus normaux [9, 210], et permet de retarder la croissance néoplasique et d'améliorer la survie des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées et de métastases expérimentales [9].

*Bifidobacterium adolescentis* a montré sa capacité à prévenir l'apparition et le développement de carcinomes colorectaux, et à produire l'apoptose tumorale *in vivo* sur modèle animal [9, 211].

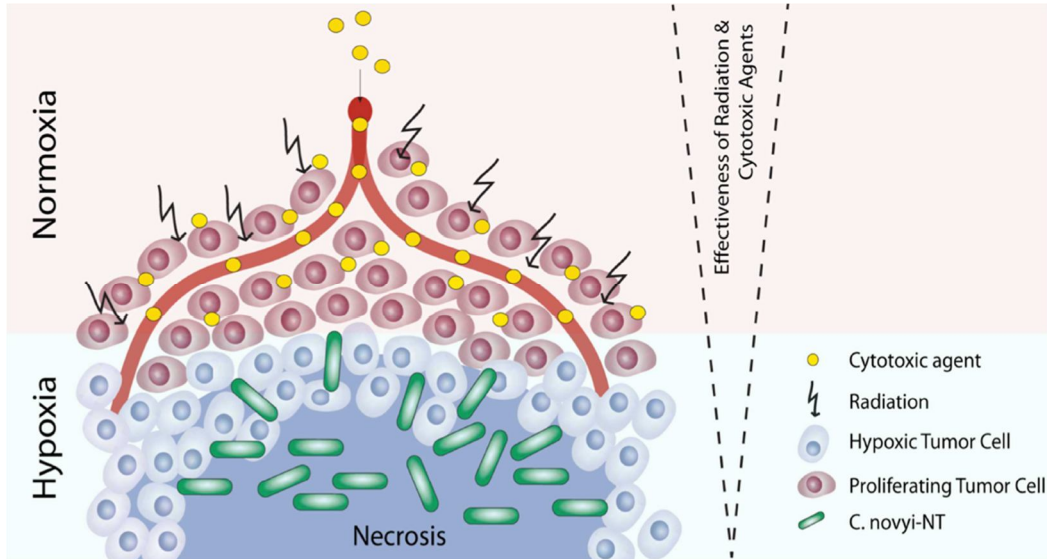
L'injection intra-tumorale du vaccin vivant atténué de la tularémie conduit à une réduction de la croissance tumorale, allant dans certains cas jusqu'à la destruction totale de la tumeur [28, 212]. Le mécanisme d'action semble passer par la réduction de l'activité du cytochrome P450, impliqué dans l'activation de promutagènes et dans la réparation de l'ADN [28, 212]. Aussi les vaccins vivants atténués de *Francisella tularensis* et de *Bacillus anthracis* prolongent le temps de latence moyen des tumeurs chimiquement induites chez les rongeurs de laboratoire [5, 28], et ralentissent la croissance de tumeurs transplantées [28].

Cependant, l'utilisation des bactéries anaérobies comme traitement oncolytique présente des résultats décevants dus à un problème récurrent ; les anaérobies colonisant facilement les zones nécrosées et peu oxygénées des tumeurs, les régions périphériques les plus vascularisées se voient épargnées. Celles-ci limitent grandement l'efficacité thérapeutique et sont responsables de recroissance et de récurrences [4, 8, 9, 38, 139, 206, 213]. L'amélioration de l'oncolyse bactérienne passerait donc par l'amélioration de la diffusion bactérienne intra-tumorale, par inhibition de la périphérie tumorale viable ou par optimisation du microenvironnement néoplasique [4].

Ainsi, des solutions furent envisagées et explorées ; l'utilisation concomitante d'une thérapeutique efficace sur les zones vascularisées, à savoir les thérapeutiques anticancéreuses classiques, mais aussi le génie génétique pour la modification des bactéries [38] permettant l'expression de cytotoxines, l'activation de prodrogues, leur utilisation en tant que vecteurs de thérapie génique, ou comme vecteurs d'effecteurs immunitaires, d'antigènes ou de facteurs de contrôle de croissance cellulaire [3]...

#### **4. Thérapie combinée :**

L'association de deux thérapeutiques anticancéreuses ciblant des populations cellulaires différentes conduit le plus souvent à une additivité de l'effet anti-tumoral et à une amélioration de l'index thérapeutique [20]. De là naquit l'idée de la thérapie combinée associant bactéries oncolytiques, ciblant les régions tumorales hypoxiques, et thérapie anticancéreuse classique [9, 213-216], plus à même de détruire les cellules oxygénées (Figure 18) [9]. Dans ce sens furent explorées différentes modalités thérapeutiques visant à améliorer le ciblage tumoral et l'efficacité de la bactériothérapie [9, 206, 214-216].



**Schematic overview of COBALT.** In tumors, blood vessels are structurally and functionally abnormal, resulting in the development of hypoxic, quiescent tumor areas and well-oxygenated, proliferating tumor regions. In COBALT therapy, *C. novyi-NT* destroys the hypoxic and necrotic parts of the tumors, which frequently give rise to relapse and are traditionally resistant to radiation and cytotoxic agents, while well-oxygenated tumor regions largely inaccessible to *C. novyi-NT* are susceptible to conventional cytotoxic therapies.

**Figure 18 :** Intérêt de la thérapie combinée dans le ciblage des composantes hypoxiques et vascularisées de la tumeur, associant ici le *Clostridium novyi-NT* aux traitements classiques [38].

### a) Radiofréquence :

La radiofréquence est une technique basée sur l'utilisation de courant alternatif de moyenne fréquence pour générer une chaleur destructrice au niveau du tissu cible.

*Clostridium oncolyticum* M-55 fut associé au traitement des tumeurs solides par radiofréquence, celui-ci supposé réchauffer le tissu tumoral et provoquer des dommages cellulaires engendrant des zones nécrotiques favorables au développement bactérien. Ainsi furent traitées 861 souris porteuses de 3 types de tumeurs du cou : carcinome solide d'Ehrlich, mélanome de Harding-Passey, et fibrosarcome induit par le méthylcolanthrène. La bactério-oncolyse fut considérablement améliorée dans tous les cas par la radiofréquence, qui amenait la température tumorale à hauteur de 42 à 44°C [9, 214].

Des études ultérieures ont visé à établir les paramètres optimaux de la combinaison : L'adénocarcinome d'Ehrlich et le mélanome de Harding-Passey implantés au niveau du cou de la souris furent prétraités par radiofréquence suivie de l'administration des spores de *Clostridium*. L'oncolyse fut maximale lorsque les spores furent administrées 12 heures après la radiofréquence initiale. La germination bactérienne a été plus rapide au niveau de l'adénocarcinome d'Ehrlich à la croissance rapide, qu'au niveau du mélanome au développement plus lent [9, 206, 215, 216].

Une étude datant de 1986 conduite par le Dr. Heppner, rassemblant les résultats de 34 ans de travaux concernant 1316 gliomes, rapporte un échec de toutes les tentatives d'éviction des récives par adjonction de différentes

approches thérapeutiques à la combinaison chirurgie-radiothérapie adjuvante. Parmi les approches testées, l'administration de spores de *Clostridium butyricum* M-55 par voie carotidienne chez 67 patients. Les auteurs de l'étude concluent tout de même à l'optimisme – réservé – généré par l'association de l'injection de *Clostridium* à la radiofréquence post-opératoire périodique [9, 217].

L'association de la radiofréquence et de l'irradiation locale aux rayons X à l'administration de *Clostridium oncolyticum* M-55 a été utilisée pour le traitement du mélanome de Harding-Passey sur modèle animal. Il en résulte un taux de guérison obtenu de 20%, le reste des animaux décédant des suites de récurrences tumorales malgré une survie prolongée. Le retraitement par la triple combinaison une deuxième et une troisième fois améliore le taux de guérison [9, 206, 216].

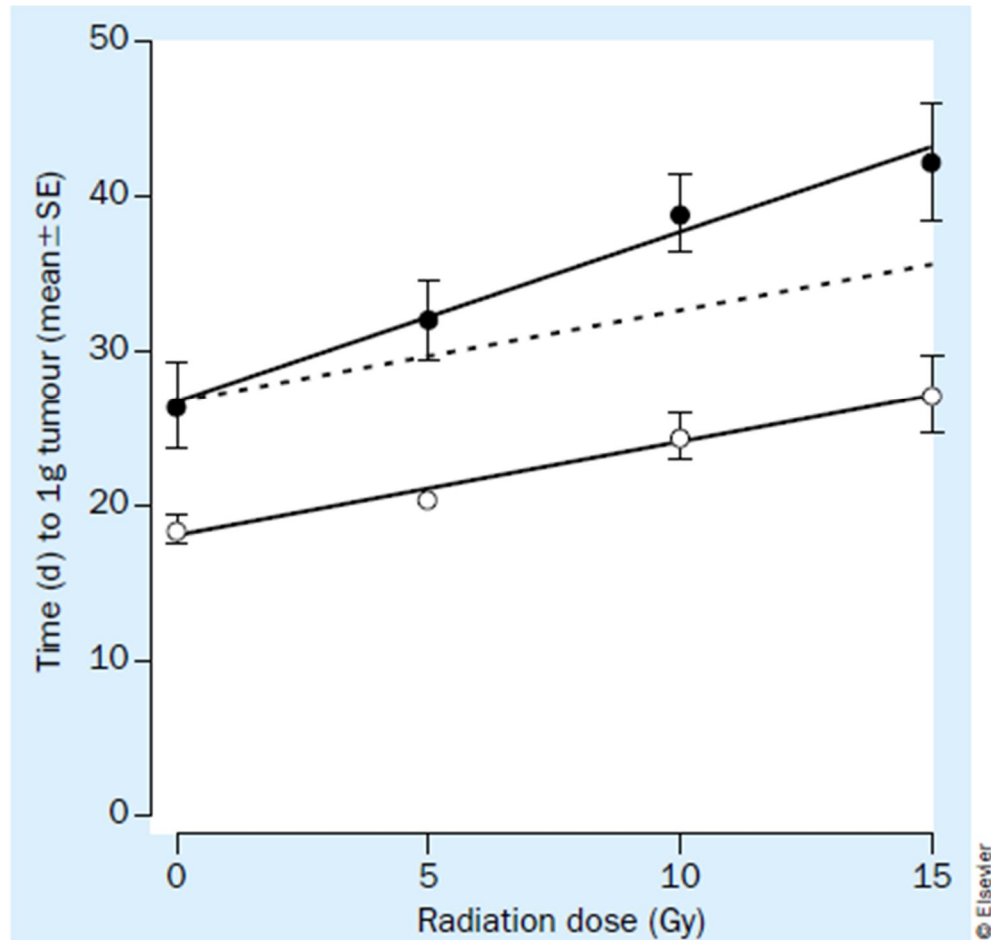
### **b) Radiothérapie :**

La radiothérapie a déjà démontré son efficacité dans le traitement de différentes tumeurs, dont les mélanomes, produisant un contrôle de la croissance tumorale voire une rémission complète chez une proportion conséquente des patients traités [20, 218].

L'association de la radiothérapie, selon trois modes différents, à la bactériothérapie à *Clostridium novyi-NT* a montré un effet additif quant à la régression tumorale et une rémission prolongée sur différents modèles tumoraux [200]. L'efficacité de l'association est supposée due à la destruction par les bactéries des cellules hypoxiques, nécrotiques peu sensibles à la radiothérapie, celle-ci étant plus efficace sur celles mieux oxygénées à prolifération rapide [9].

L'adjonction de radiothérapie à faible dose à la bactériothérapie à *Salmonella* a permis la réduction du pouvoir d'échappement immunitaire tumoral [4]. La radiothérapie à dose faible (4 Gy) seule n'induit aucun effet significatif sur la croissance du mélanome. Cependant, elle permet d'augmenter l'expression de surface du Complexe Majeur d'Histocompatibilité I (CMH I) au niveau des cellules néoplasiques exposées [54, 219], potentialisant ainsi l'activité immuno-dépendante de *Salmonella* médiée essentiellement par les LT CD8, ce qui conduit à un freinage significatif de la croissance tumorale [54]. La répétition de l'exposition aux radiations améliore d'autant plus l'effet anti-tumoral obtenu [54].

Platt et al. explorèrent l'utilité de l'association de *Salmonella* à la radiothérapie aux rayons-X pour le traitement de mélanomes et d'autres tumeurs [20, 220]. Des tumeurs B16F10 implantées chez la souris furent traitées par une irradiation par une dose unique de 5 à 15 Gy, par *Salmonella* ou par l'association des deux, et la durée nécessaire à la constitution d'une tumeur de 1 gramme depuis l'implantation fut notée (Figure 19). L'irradiation seule prolonge le temps nécessaire à la formation d'une tumeur de 1g. *Salmonella* seule provoque un délai de 8 jours par rapport aux tumeurs contrôles. L'association des deux thérapeutiques résulte en un effet supra-additif, supérieur à l'effet additif attendu, associé à une amélioration de la survie (Figure 20). Des résultats similaires furent obtenus pour le mélanome S91 de Cloudman implanté en sous-cutané chez la souris DBA/2J [20].

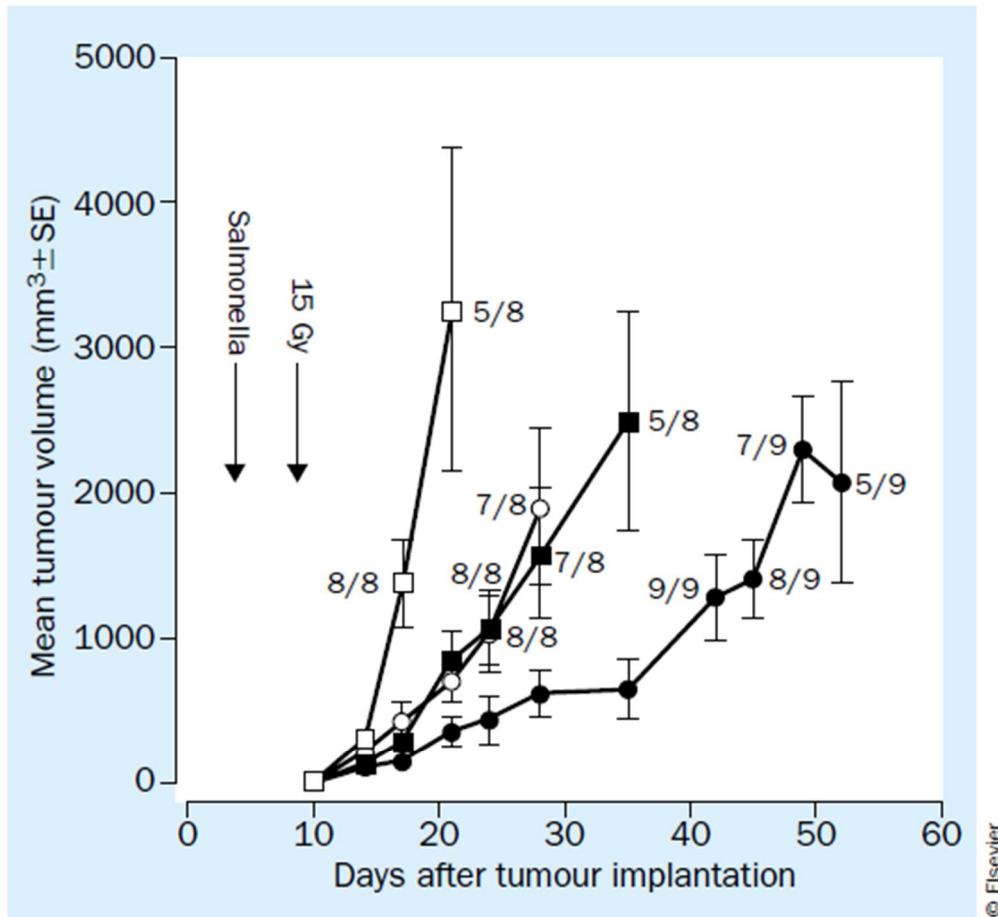


Time to 1 g tumour after subcutaneous implantation of  $5 \times 10^5$  B16F10 mouse melanoma cells into C57B6 mice followed 7 days later by intravenous injection of YS1646. 4 days later, mice were irradiated with X-rays at doses of 5–15 Gy. Antitumour effects expected from additive interactions between the x-ray and *Salmonella* treatments (dashed line). White circles, no *Salmonella*; black circles, with *Salmonella*.

Cercles blancs : Radiothérapie ; Cercles noirs : Radiothérapie associée à *Salmonella* ;

Ligne pointillée : Effet additif attendu.

**Figure 19 :** Impact sur la croissance tumorale de la radiothérapie seule et associée à *Salmonella* [20].



Effects of 15 Gy with and without *Salmonella* strain YS1646, on the growth of B16F10 mouse melanomas after subcutaneous implantation of  $5 \times 10^5$  B16F10 cells in C57B6 mice. White squares, not irradiated; white circles, *Salmonella* only; black squares, x-rays only; black circles, *Salmonella* plus x-rays.

Carrés blancs : Souris de contrôle non traitées ; Cercles blancs : *Salmonella* ; Carrés noirs : Radiothérapie ; Cercles noirs : Thérapie combinée.

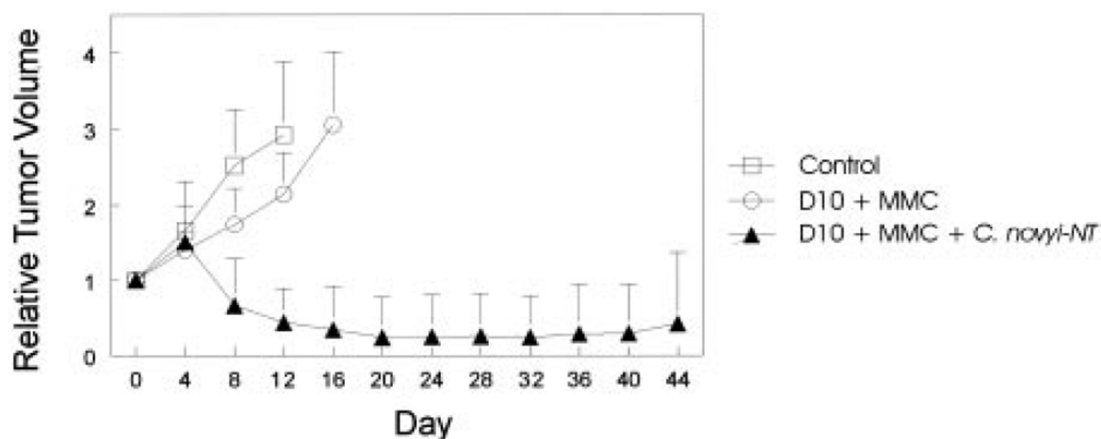
**Figure 20 :** Impact sur la croissance tumorale de l'administration de *Salmonella* seule, de l'irradiation seule, et de l'administration des deux à la fois [20].

### c) Chimiothérapie :

La thérapie bactériolytique combinée COBALT (Combined Bacteriolytic Therapy), associe la bactérie aux traitements chimiothérapeutiques habituels tels que la Dolastatine-10 et la Mitomycine C. L'oncolyse induite par cette approche est importante [4], largement supérieure à l'activité anti-tumorale produite par chacune des deux thérapies utilisée seule (Figure 21) [20, 91], allant jusqu'à dépasser les seuils de tolérance des cobayes provoquant le décès par toxémie ou par syndrome de lyse tumorale. Afin de réduire cette toxicité systémique, des agents chimiothérapeutiques interagissant avec les microtubules (microtubule-interacting chemotherapeutic agents) tels que la Vinorelbine et le Docetaxel ont été utilisés. Des résultats prometteurs en découlèrent, et des essais cliniques phase I chez l'Homme sont en cours [9].

Le *Clostridium novyi-NT* fut utilisé dans le cadre de la stratégie COBALT en association avec la Dolastatine-10, la Mitomycine C et le Cytosan. Le traitement de tumeurs coliques HCT116 implantées en sous-cutané sur des souris nude par la Dolastatine-10 et la Mitomycine C associées au *Clostridium novyi-NT* conduit à une régression tumorale franche. 7 des 8 souris traitées présentent une régression du volume tumoral, et la moitié présente la guérison après seulement une administration. 4 des 5 animaux survivant à la thérapie présentent une rémission complète persistant pendant plus de 3 mois. En contrepartie, le traitement des mêmes tumeurs par les deux thérapeutiques chimiothérapeutiques seules ne conduit qu'à un ralentissement de la croissance tumorale, les masses atteignant 10% du poids de l'animal en 10 à 14 jours (Figure 22). Des résultats similaires furent obtenus pour des mélanomes B16

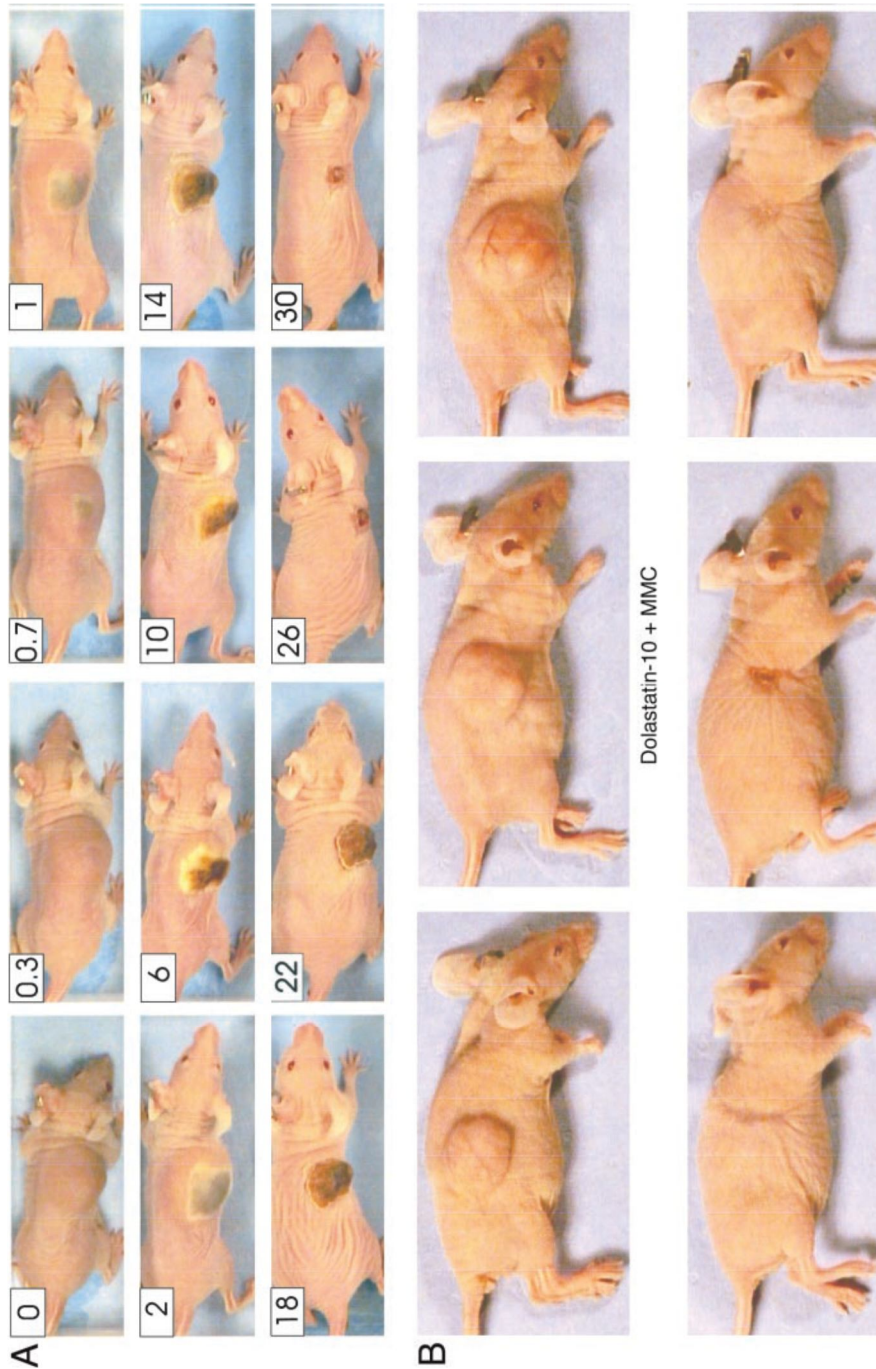
implantés chez des souris nues, avec l'utilisation de Cytosan en lieu et place de la Mitomycine C car plus efficace sur cette tumeur [91].



Quantification of the effects of COBALT. HCT116 colorectal cancer cells were grown as xenografts in nude mice. When the tumors were  $\approx 700 \text{ mm}^3$  in size, the animals were injected intravenously with  $5 \times 10^7$  *C. novyi-NT* spores (time 0), followed by i.v. injection with D10 (0.3 mg/kg) at 24 h and i.p. injection with MMC (4 mg/kg) at 48 h. Control groups were given no treatment or treated with D10 plus MMC without spores. Each group consisted of six to ten mice. Animals were killed when their tumors exceeded 10% of body weight. In the experiment shown, seven of eight mice treated with a single dose of COBALT developed a striking hemorrhagic necrosis of their tumors within 24 h after administration of D10. Four of these seven mice were cured, whereas three of the mice died three days after treatment, perhaps from tumor lysis syndrome. One mouse developed less extensive necrosis and its tumor eventually regrew. Only mice that survived treatment were used to obtain the data plotted in the graph.

D10 : Dolastatine-10 ; MMC ; Mitomycine C ; *C.* : *Clostridium* ; i.v. : intraveineuse ; i.p. : intrapéritonéale.

**Figure 21 :** Quantification des effets de la stratégie COBALT sur des tumeurs HCT116 implantées chez les souris nudes [91].



Hemorrhagic necrosis following COBALT. (A) HCT116 tumor-bearing mouse 24 h after i.v. injection with  $5 \times 10^7$  *C. novyi-NT* spores. Slight swelling associated with edema is seen at the tumor site. D10 (0.3 mg/kg) was then given intravenously (time = 0), and followed 24 h later with MMC (4 mg/kg). A black spot indicating hemorrhagic necrosis is evident near the center of the tumor at 0.3 days. The area of hemorrhagic necrosis gradually expanded over the next day (time = day 1). Swelling at the tumor site then resolved and the necrotic tumor mass shrunk and gradually dissolved (time = days 2–30). (B) Selected mice 5 weeks after treatment with a single dose of D10 plus MMC (Upper) or with a single dose of COBALT (Lower). Of the eight mice treated with COBALT in this experiment, four were apparently cured of their tumor, and three of these are shown.

D10 : Dolastatine-10 ; MMC : Mitomycine C ; (Temps écoulé exprimé en jours).

**Figure 22 :** (A) Nécrose hémorragique secondaire à la stratégie COBALT et (B) comparaison de l'efficacité de la chimiothérapie (haut) et de la thérapie combinée (bas) après 5 semaines [91].

L'association de 5-Fluorouracile (5-FU), de 5-Fluorodeoxyuridine, ou de cyclophosphamide au *Clostridium* permet d'améliorer la réponse oncolytique [38, 48, 221].

L'association de cisplatine à faible dose améliore la diffusion intratumorale de *Salmonella choleraesuis* avec une concentration tissulaire de près de 100 fois supérieure à celle obtenue par l'administration de la bactérie seule [4, 94]. La combinaison retarde la croissance tumorale et améliore significativement la survie, avec des résultats largement supérieurs à ceux obtenus par l'usage de chacune des deux thérapeutiques seule : la combinaison permet, pour l'hépatome murin ML-1, une réduction du volume tumoral plus importante de 55 et 77% par rapport à l'utilisation respective de *Salmonella choleraesuis* seule et de la cisplatine seule. Des résultats similaires sont obtenus pour le carcinome pulmonaire murin de Lewis LL/2, pour lequel la combinaison produit une réduction plus importante de 46% par rapport à l'utilisation de *Salmonella choleraesuis* seule, et de 70% par rapport à celle obtenue par l'utilisation de la cisplatine seule [94].

## 5. Thérapie génique par vecteurs bactériens :

Le développement de l'ADN recombinant a relancé l'intérêt de la bactériothérapie oncolytique en ouvrant la porte à l'optimisation génétique des souches sauvages, et à l'exploration de stratégies nouvelles sublimant l'effet anti-tumoral [9]. Le potentiel bactérien de servir en tant que système d'expression protéique étant ce qu'il est [20], de ces stratégies fut la conception de souches sécrétant diverses substances anti-tumorales comprenant des

enzymes de conversion de prodrogues, des cytokines, et autres protéines [9], mettant à profit la capacité bactérienne à coloniser préférentiellement le tissu néoplasique pour une distribution thérapeutique ciblée [3]. Une troisième caractéristique bactérienne exploitée dans le cadre de la thérapie génique est la capacité de transmettre l'information génétique aux cellules hôtes par le biais de plasmides [222]. Ainsi, l'insertion de plasmides contenant des gènes à potentiel thérapeutique au niveau des bactéries permet de les livrer spécifiquement aux cellules anormales, qui vont alors exprimer ceux-ci même après élimination des germes vecteurs [3].

En somme, la thérapie génique par vecteurs bactériens se fait selon deux approches : la répllication bactérienne tumorale spécifique et le transfert intracellulaire de plasmides [223].

Les premières bactéries à être utilisées comme vecteurs furent celles du genre *Clostridium* [20]. La première espèce de *Clostridium* à intégrer un gène exotique est le *Clostridium sporogenes*, de son premier nom *Clostridium butyricum M-55* ou *oncolyticum*, et ce par les travaux de Schlechte et Elbe qui y introduisirent le gène d'*Escherichia coli* codant pour la bactériocine Colicine E3 à activité oncostatique [9, 224]. Les résultats obtenus lors de ces études se sont révélés insatisfaisants, les souches recombinantes ne semblant pas avoir l'effet escompté. La cause fut imputée à la technique de transformation génétique basée sur les plasmides vecteurs et l'électro-transformation qui n'était pas adaptée. Ultérieurement, les techniques de transfert génétique furent optimisées [9, 225, 226] et permirent d'obtenir des résultats intéressants.

En général, la modification génétique des bactéries oncolytiques conduit à une activité anti-tumorale supérieure pour nombre de tumeurs solides [9, 227].

**a) Agents inducteurs de mort cellulaire :**

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL ou TNFSF10) est une cytokine qui provoque la mort des cellules tumorales [228]. En se liant aux récepteurs de mort cellulaire 4 et 5 (Death Receptors 4 et 5 : DR4 et DR5), elle active la cascade des caspases en commençant par la caspase-8 initiatrice qui active à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7, conduisant ainsi à l'apoptose. *Salmonella Typhimurium* recombinante exprimant le TRAIL murin sous contrôle du promoteur *recA* radio-inductible a permis la réduction de la croissance de tumeurs du sein syngéniques de la souris BALB/c [3, 229].

Second Mitochondria-derived Activator of Caspases (SMAC, aussi appelé DIABLO) est une protéine mitochondriale dont l'effet antagoniste à l'activité des protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor of Apoptosis Proteins : IAP) promeut, avec le cytochrome C, l'activation des caspases [230], notamment la caspase 9. L'usage de *Salmonella Typhimurium* porteuse de plasmides coexprimants les protéines TRAIL et DIABLO induit une inhibition synergique de la croissance tumorale et une amélioration de la survie des souris traitées [3, 231].

Le Fas Ligand (FasL) est une autre cytokine de la famille des Tumor Necrosis Factors (TNF) qui, une fois fixée sur son récepteur Fas, induit l'apoptose et la régulation du système immunitaire et de la croissance tumorale [232, 233]. Le recours à *Salmonella Typhimurium* recombinante produisant le FasL – sous l'effet d'un promoteur *ompC* constitutif sensible aux variations

osmolaires du milieu – conduit au freinage de la croissance de cancers du sein et de cancers colorectaux syngéniques chez les souris BALB/c [3, 234].

### **b) Effecteurs Immunitaires :**

Les cytokines sont peu utilisées en thérapie anti-cancéreuse malgré leur efficacité, du fait de la toxicité qu'elles provoquent lorsqu'administrées par voie systémique [235, 236]. Ainsi, le recours aux vecteurs bactériens permettant une livraison spécifique et limitée au niveau tumoral offre la possibilité de contourner ce problème [3, 4]. Les gènes codant pour différentes cytokines ont pu être intégrés avec succès au capital génétique de *Salmonella Typhimurium*, induisant une production effective de celles-ci par la bactérie.

L'Interleukine 2 (IL2) permet l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, et joue un rôle dans la prolifération lymphocytaire et la mémoire immunitaire. Elle a été approuvée par la Food and Drug Association (FDA) comme traitement du mélanome métastatique et du cancer du rein. *Salmonella Typhimurium* sécrétant l'IL2 a permis l'augmentation de la population systémique de cellules NK [4] et la réduction de tumeurs hépatiques métastatiques [237] et de métastases pulmonaires d'ostéosarcomes sur modèle murin [3, 238].

L'interleukine 4 (IL4) joue un rôle dans la différenciation des lymphocytes T helper (T<sub>h</sub>2), et dans la stimulation et la différenciation des lymphocytes B (LB) activés en plasmocytes [239]. L'interleukine 18 (IL18) possède une activité similaire à celle de l'IL2 et promeut la prolifération des lymphocytes T (LT) et des Natural Killers (NK), et favorise leur production de cytokines [240].

*Salmonella typhimurium* produisant l'une des deux cytokines au niveau néoplasique permet d'augmenter les niveaux plasmatiques d'Interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) [241]. La production d'IL18 spécifiquement inhibe la croissance des fibroblastes stromaux, source majeure d'agents angiogéniques, ce qui a pour conséquence une inhibition de la néovascularisation tumorale [3, 242].

La chimiokine CCL21 (C-C motif Chemokine Ligand 21) est impliquée dans la migration des cellules immunocompétentes et dans l'organisation des organes lymphoïdes secondaires. La TNFSF14 (Tumor Necrosis Factor Super Family member 14) est une cytokine de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factors) qui déclenche l'apoptose au niveau des cellules tumorales, stimule la prolifération des lymphocytes T et la croissance des cellules dendritiques [3]. *Salmonella* recombinante productrice de CCL21 et de TNFSF14 a induit l'inhibition de la croissance tumorale par l'attraction des leucocytes et des neutrophiles vers la tumeur [3, 243, 244].

Les gènes codant pour l'IL2 et le TNF- $\alpha$  ont pu être également intégrés au capital génétique d'une souche saccharolytique de *Clostridium* : *Clostridium acetobutylicum*, qui a pu ainsi produire des quantités de cytokines laissant présager une efficacité anti-tumorale lorsqu'utilisé comme traitement [9, 235, 245].

### c) **Immunsation anti-tumorale :**

Le système immunitaire, lorsque fonctionnel, permet l'inhibition de la croissance si ce n'est l'élimination des cellules tumorales. Le rapport système immunitaire-tumeur maligne se fait selon 3 phases selon le concept de

l'immunoediting [246]. La première est la phase d'élimination, où l'immunité détruit activement les cellules néoplasiques immunogènes. Malgré cela, des cellules tumorales résiduelles persistent sans se multiplier dans un état d'équilibre entre immunité et néoplasie : c'est la seconde phase, qui serait conséquence de l'apparition de cellules immuno-résistantes, qui ne présenteraient pas d'antigènes tumoraux, par mutation et sélection sous la pression immunitaire. Cet état de latence peut perdurer plusieurs années sans que le malade ne présente de manifestations de pathologie évolutive. Par la suite survient la phase d'échappement, du fait de l'affaiblissement immunitaire inhérent au vieillissement naturel ou découlant de l'activité immunosuppressive des cellules néoplasiques suffisamment mutées. L'administration d'antigènes pourrait avoir un effet immunostimulant, permettant de faire pencher la balance en faveur du système immunitaire lors de la phase latente [3].

Le système de sécrétion de type III (Type Three Secretion System : TTSS) est un composé protéique bactérien servant à l'injection de facteurs de virulence tels que la toxine shiga-like d'*Escherichia coli* entéropathogène ou les produits des gènes *sop/sip* de *Salmonella*. Il est formé de près de 30 constituants protéiques différents, assemblés en un dispositif ressemblant à une seringue et son aiguille. *Salmonella Typhimurium* a pu être utilisée comme vecteur livrant des antigènes spécifiques au niveau tumoral en mettant à profit le système de sécrétion de type III (Type Three Secretion System : TTSS ou T3SS) [3].

Ainsi, le NY-ESO-1, antigène spécifique au mélanome, a pu être livré sous forme d'une protéine de fusion : la protéine *sopE*-NY-ESO-1 composée de l'antigène associé à la protéine exprimée par le gène *sopE*, ce qui a permis l'initiation d'une réaction immunitaire anti-tumorale médiée par les lymphocytes

T CD8 et T CD4 [3, 247]. L'inoculation orale de la bactérie modifiée à des souris BALB/c porteuses de sarcomes CMS5a exprimant le dit antigène conduit à la régression tumorale. L'administration directe des bactéries dans les sarcomes CMS5a n'exprimant pas l'antigène NY-ESO-1 chez des souris BALB/c a permis de transmettre l'antigène aux cellules tumorales : l'analyse immunohistochimique de ces tumeurs réséquées montre la présence du NY-ESO-1 à leur niveau. La même expérience reconduite chez des souris préalablement immunisées contre le NY-ESO-1 produit une régression tumorale suite à l'injection bactérienne, avec notamment le développement d'une réponse immune médiée par les lymphocytes T CD8 envers d'autres antigènes exprimés par la tumeur : c'est le phénomène de l'« epitope spread » [247].

L'« epitope spread » (extension d'épitope) est un phénomène par lequel la réponse immunitaire déclenchée initialement par un antigène donné se voit étendue à d'autres antigènes, en dehors de toute réaction immune croisée. Ceci signifie qu'il est possible de déclencher une réaction immunitaire contre le tissu tumoral par l'administration d'antigènes n'ayant aucun lien avec celui-ci. L'administration d'antigènes issus de virus communs ubiquitaires – tels que l'Epstein Barr Virus (EBV) ou le virus influenza – fut proposée, afin de pouvoir mettre à profit les lymphocytes T CD8 préexistants chez les patients qui ont forcément été contaminés par ceux-ci au cours de leur vie [3, 247].

Une tentative de vaccination anti-tumorale a aussi été entreprise selon la même stratégie usant du pouvoir sécrétoire du TTSS (Type Three Secretion System). Des souris BALB/c furent initialement immunisées contre la protéine p60<sub>217-225</sub> – muréine hydrolase sécrétée normalement par *Listeria monocytogenes* – par l'administration orale de *Salmonella* sécrétant celle-ci au travers du TTSS.

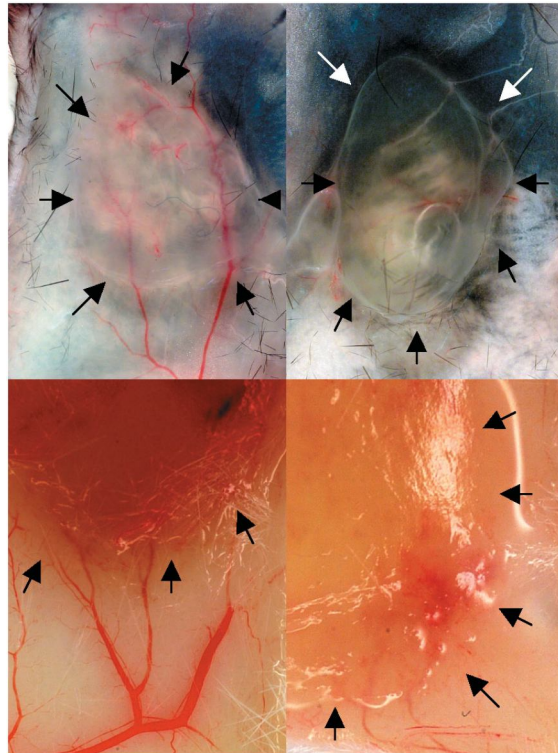
Cette même protéine fut incorporée dans des cellules de fibrosarcome WEHI 164 – tumeur chimiquement induite chez la souris BALB/c – avant que celles-ci ne soient implantées chez les souris immunisées. Les résultats de cette expérience montrent que l'implant néoplasique fut rejeté par 80% des souris immunisées, pendant que 100% des souris de contrôle non vaccinées voient les sarcomes se développer [248].

#### d) Inhibition de l'angiogénèse :

L'insertion d'un plasmide contenant le gène codant pour le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2), récepteur du facteur angiogène VEGF, permet l'initiation d'une réaction immunitaire à médiation lymphocytaire T dirigée contre le récepteur, qui joue ainsi le rôle d'antigène. La destruction immunitaire du VEGFR2 au niveau tumoral ainsi déclenchée permet l'inhibition de la néoangiogénèse (Figure 23), et donc le contrôle de la croissance néoplasique. Ainsi l'administration orale de *Salmonella typhimurium* munie de ce plasmide a permis de développer une résistance vis-à-vis de tumeurs syngéniques, incluant mélanome, carcinome colique et carcinome pulmonaire, perdurant plus de 10 mois. Cette vaccination à ADN ainsi conduite a également permis la réduction de la croissance de métastases pulmonaires du carcinome colique CT26 avec survie de la totalité des souris traitées, contre le décès des souris de contrôle à partir de 28 jours d'évolution tumorale [249].

Le recours à des plasmides codant pour des facteurs inhibiteurs directs de l'angiogénèse – tels que l'endostatine et la Thrombospondine-1 (THBS1) – permet le contrôle de la croissance tumorale de façon immuno-indépendante.

L'endostatine agit par compétition avec le VEGF et le Fibroblast Growth Factor (FGF), limitant ainsi l'angiogenèse ou provoquant l'apoptose des cellules endothéliales. La Thrombospondine-1 (THBS1) quant à elle stimule l'expression de Fas Ligand (FasL) qui, une fois fixé sur son récepteur Fas, induit l'apoptose des cellules endothéliales [3].



Inhibition of VEGF or bFGF-induced angiogenesis. C57BL/6J mice ( $n = 8$ ) were vaccinated with either attenuated *S. typhimurium* harboring the empty vector pcDNA3.1 (left panels) or the vector pcDNA3.1-FLK1 (right panels). Vascularization was induced either by VEGF (upper panels) or bFGF (lower panels). Arrows indicate borders of Matrigel plugs.

Vector pcDNA3.1 : Vecteur de contrôle ne permettant pas l'immunisation ; Vector pcDNA3.1-FLK1 : Vecteur contenant le gène FLK1 exprimant le VEGFR2 permettant l'immunisation ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor.

**Figure 23 :** Inhibition de l'angiogénèse induite par VEGF et bFGF suite à l'immunisation par *Salmonella typhimurium* produisant le VEGFR2, mise en évidence sur souris selon le Matrigel assay. Souris de contrôle sur les images de gauche, souris traitées sur les images de droite [249].

\*Le Matrigel assay est utilisé pour l'évaluation de l'angiogénèse et l'anti-angiogénèse. Ici, il consiste en l'injection sous-cutanée de Matrigel – extrait de la tumeur de Engelberth-Holm-Swarm – mélangé à des agents angiogéniques (VEGF en haut, bFGF en bas) qui permettent le développement d'une vascularisation à hauteur de celui-ci (souris de contrôle) [250].

### e) **Déplétion de molécules essentielles à la survie tumorale :**

L'interférence par ARN est un mécanisme intracellulaire d'extinction de gènes, initié par les petits ARN interférents (small interfering RNA : siRNA) introduits expérimentalement ou naissants de l'ARN double brin (double stranded RNA : dsRNA) sous l'action de l'enzyme Dicer. Le siRNA s'associe au complexe d'extinction de gènes induit par ARN (RNA-Induced Silencing Complex : RISC) pour cibler et détruire l'ARN messager complémentaire (mRNA) sous l'effet des protéines Argonautes, inhibant ainsi l'expression du gène correspondant [251, 252].

L'une de ces molécules nécessaires à la survie des cellules néoplasiques est l'oncoprotéine STAT3, dont l'activation permanente non régulée dans les cellules tumorales stimule la croissance cellulaire, inhibe le système immunitaire et favorise la survenue de métastases. La déplétion de STAT3 par interférence par ARN (RNA interference : RNAi) par le biais de small/short hairpin RNA (shRNA) transmis par *Salmonella Typhimurium* a permis le contrôle de la croissance de cancer de la prostate RM1 syngénique [253]. Le ciblage d'autres oncoprotéines telles que la Survivine (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 : BIRC5), responsable de l'inhibition de l'apoptose et du développement de chimiorésistance des cellules néoplasiques [254], associé à l'expression de GRIM-19 qui possède une activité pro-apoptotique [255], a permis la réduction de la croissance de cancers de la prostate et du larynx [3, 256, 257].

#### **f) Rétablissement de gènes protecteurs :**

Le gène p53, surnommé « gardien du génome », est souvent muté dans les cellules tumorales. C'est le cas dans le cancer du col secondaire à l'infection papillomateuse où la protéine p53 est spécifiquement ciblée par l'oncoprotéine E6 produite par le Papilloma Virus Humain (HPV) [3]. Le recours à des plasmides codant pour la protéine p53 et pour un shRNA (short hairpin RNA) ciblant la protéine E6 a permis la limitation de la croissance du cancer du col humain implanté chez la souris [258].

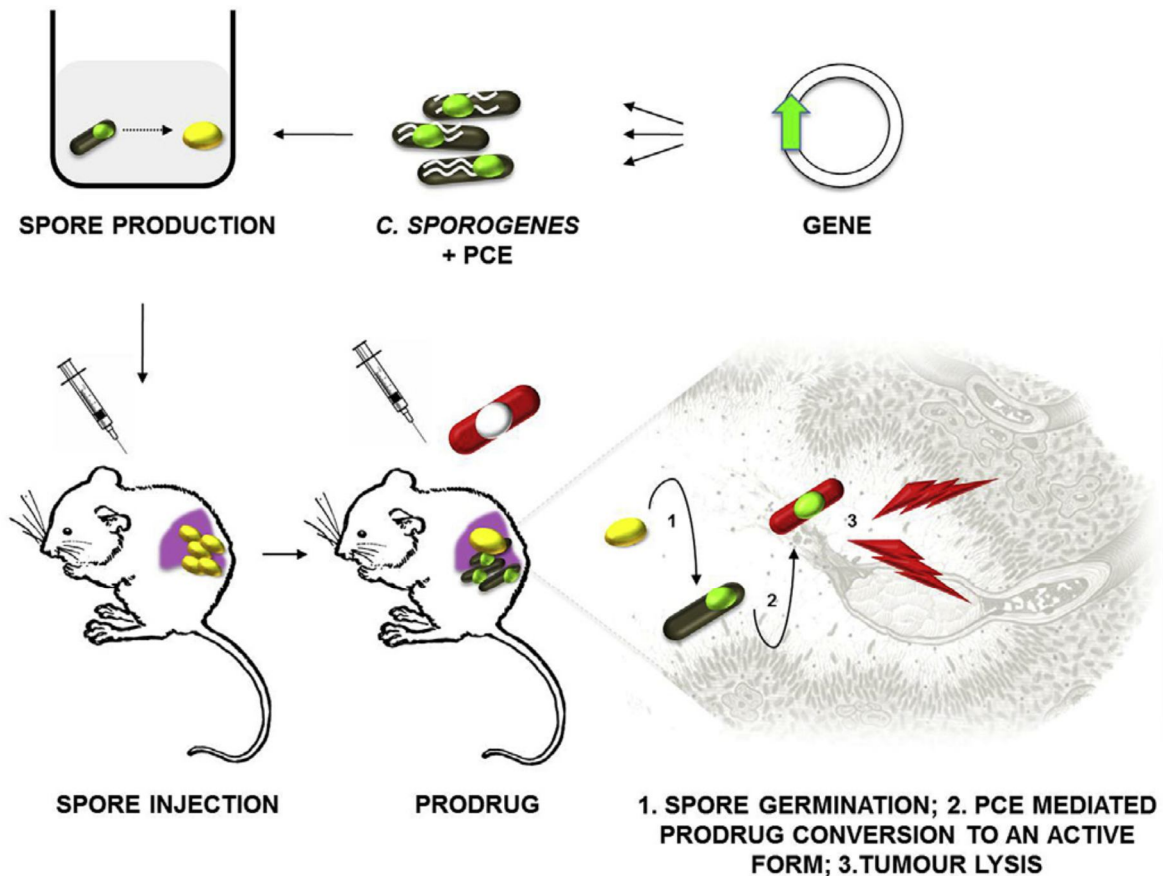
#### **g) Directed Enzyme Prodrug Therapy (DEPT):**

La thérapeutique anticancéreuse idéale serait celle qui, en outre d'être efficace, serait spécifique envers le tissu néoplasique, épargnant le tissu sain. Une des stratégies envisagées dans ce sens est le recours à des prodrogues inactives, qui seraient activées intrinsèquement à la tumeur par le biais d'enzymes spécifiquement localisées à son niveau : Enzymes de conversion de prodrogues (Prodrug Conversion Enzymes : PCE). Cette approche porte le nom de Directed Enzyme Prodrug Therapy (DEPT) [1]. L'un des avantages majeurs qu'elle présente est la quantité importante de drogue cytotoxique produite par chaque unité enzymatique au niveau tumoral, doublée par ce qui est appelé le « bystander effect » (effet du spectateur passif), phénomène par lequel les cellules avoisinantes non exposées à la drogue sont sujettes aux mêmes effets oncolytiques [1, 225, 259].

L'une des découvertes notables dans ce cadre fut celle de la prodrogue CB1954 [5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide] [1]. Son efficacité vis-à-vis du

carcinome de Walker 256 chez le rat, contrastant avec son inoffensivité envers d'autres néoplasies notamment humaines [260], fut liée après plus ample exploration à l'expression par la tumeur de Walker d'une enzyme unique : la DT-diaphorase, nommée systématiquement NQO1 (NAD(P)H:quinone oxydoréductase). Cette dernière permet l'activation de la CB1954 par réduction de ses groupements nitrogènes auxochromiques. L'hydroxylamine résultant, puissant agent alkylant [20], entraîne un effet cancéro-statique par promotion de la formation au niveau de l'ADN de liaisons inter-caténares C8-O6 inefficacement réparées par la cellule [261, 262]. Des enzymes d'origine bactérienne ayant une activité similaire à celle de la DT-diaphorase furent découvertes par la suite [263], parmi lesquelles les quinone réductases NAD(P)H dépendantes d'*Escherichia coli* et du *Bacillus amyloliquefaciens* [1].

A partir de là, diverses solutions ont été envisagées pour intégrer ces enzymes spécifiquement au niveau de tumeurs ne les produisant pas initialement. Les premiers vecteurs mis au point furent basés sur la fusion des enzymes sur des anticorps spécifiques dirigés contre la tumeur (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy : ADEPT), ainsi que sur le recours à des vecteurs viraux et non viraux dans le cadre de la thérapie génique, visant à intégrer le gène codant pour l'enzyme au capital génétique des cellules néoplasiques spécifiquement (Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy : GDEPT). Le recours aux bactéries du genre *Clostridium* en tant que vecteur est une approche plus récente : Clostridial-Directed Enzyme Prodrug Therapy (CDEPT) (Figure 24) [1, 24, 264].



Mechanism of Clostridial-Directed Enzyme Prodrug Therapy (CDEPT) utilising *C. sporogenes* engineered spores as a delivery vector. Briefly, a nitroreductase gene (PCE) is expressed and integrated into the chromosome of *C. sporogenes*. Spores of the therapeutic strain are being prepared in commercial environments and injected into tumour-bearing animal. After tumour colonisation, a prodrug is delivered. Inside the tumour upon the spore germination, the expressed PCE subsequently converts the prodrug into a cytotoxic derivative destroying cancer cells.

**Figure 24 :** Mécanisme de CDEPT par utilisation du *Clostridium sporogenes* comme vecteur : le gène l'enzyme de conversion de prodrogue (PCE) est intégré au capital génétique de la bactérie [1].

La cytosine déaminase est une enzyme bactérienne possédant la faculté de convertir la 5-fluorocytosine (5-FC), antimycosique ordinaire [8], en 5-fluorouracile actif (5-FU) [20, 38]. Fox et al. furent les premiers à cloner le gène de la cytosine déaminase (CD) d'*Escherichia coli* en vecteur d'expression clostridien, et à insérer celui-ci au niveau de *Clostridium beijerinckii* [4, 9, 20, 265] avec succès : Des taux élevés de cytosine déaminase ont été détectés au niveau du milieu bactérien [20], et la sensibilité du carcinome murin EMT6 au 5-Fluorouracile a pu être augmentée de 500 fois *in vitro* [9, 265].

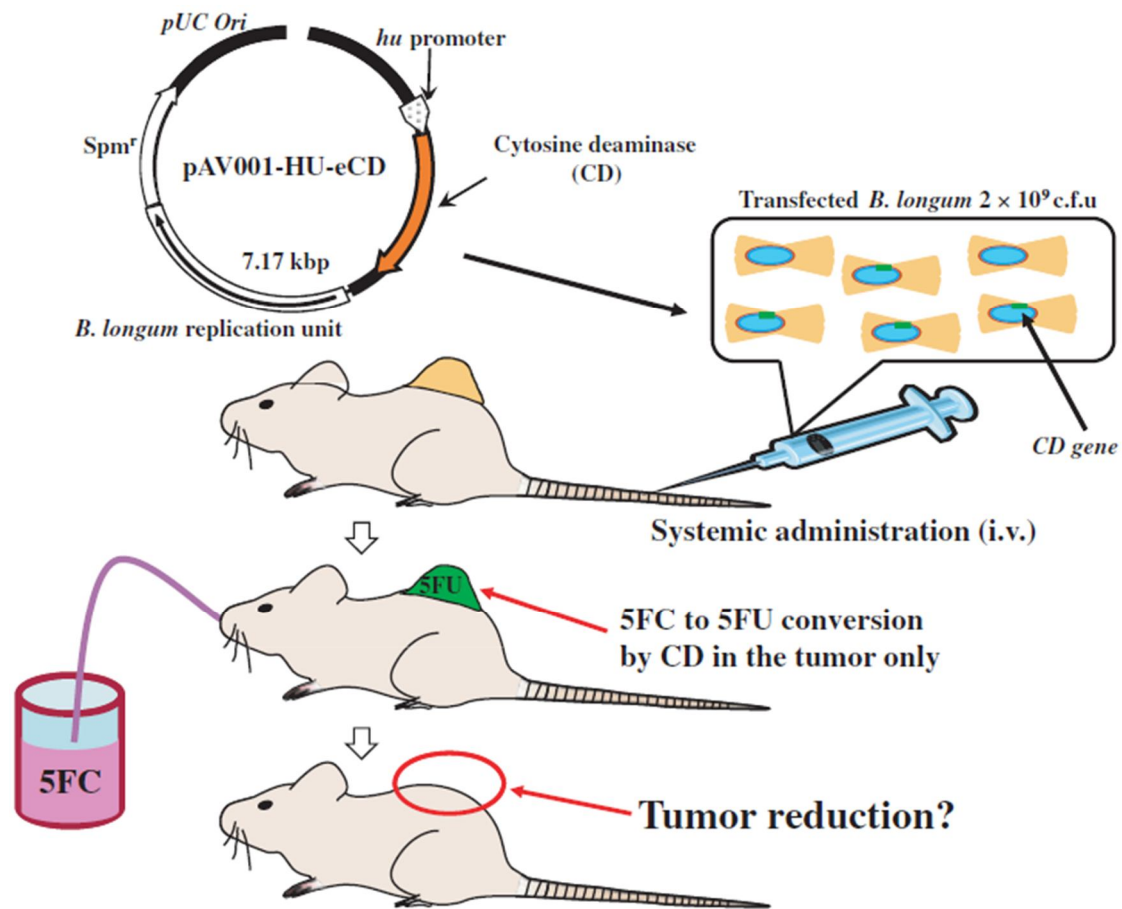
L'insertion de la cytosine déaminase (CD) a été testée sur différentes souches saccharolytiques de *Clostridium* à valeur industrielle, notamment *acetobutylicum*, *beijerinckii* et *butyricum* [266]. *Clostridium acetobutylicum* ainsi modifié a pu produire l'enzyme active aussi bien *in vitro* [266] que *in vivo* après administration intra-tumorale chez le rat WAG/Rij porteur de rhabdomyosarcome [9, 267]. L'introduction du gène de la nitroréductase (NTR) d'*Escherichia coli* au niveau du *Clostridium beijerinckii*, réalisée par Minton et al. [20], a permis l'amélioration de l'effet anti-tumoral de la CB1954 *in vitro*. *In vivo*, l'activité de l'enzyme a été détectée au niveau du tissu néoplasique suite à l'administration intraveineuse de la bactérie chez la souris porteuse de la tumeur EMT6 [9, 20, 264].

Malgré des résultats initiaux encourageants, les études sur modèle animal furent décevantes : l'administration de *Clostridium beijerinckii* ou *Clostridium acetobutylicum* recombinants ne produit pas d'activité anti-tumorale après injection systémique de la prodrogue. La raison de cet échec revient à la faible colonisation tumorale produite par les souches saccharolytiques qui est 1000 fois

inférieure à celle produite par la souche protéolytique *Clostridium sporogenes* [9, 268].

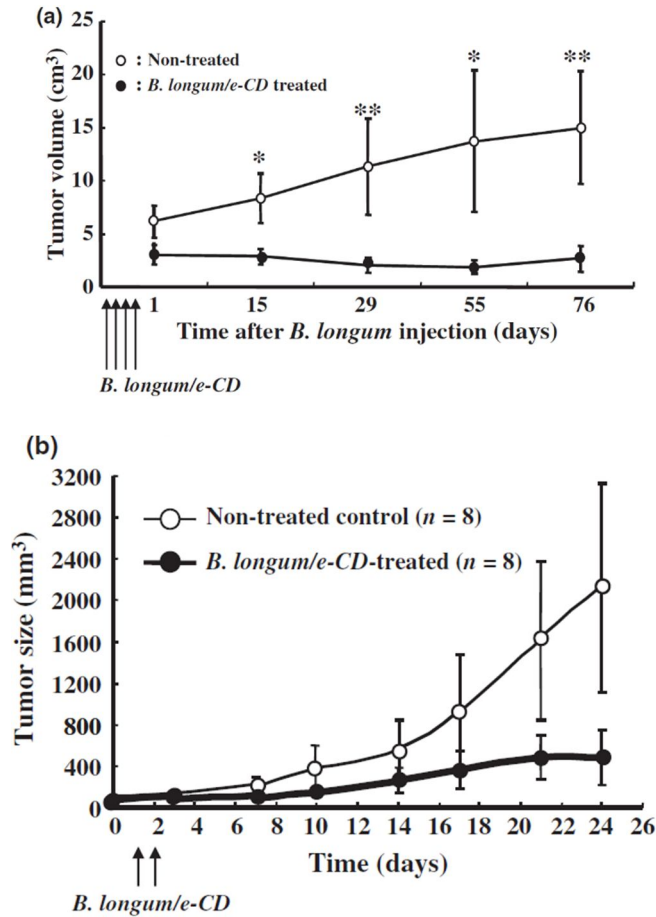
L'usage des souches protéolytiques dans le même sens conduit à de bien meilleurs résultats. Le *Clostridium sporogenes* doté du gène de la cytosine déaminase d'*Escherichia coli* produit une activité enzymatique importante localisée au niveau tumoral. Lors de l'administration de 5-Fluorocytosine (5-FC), l'activité antinéoplasique engendrée s'avère équivalente ou supérieure à celle produite par la dose maximale tolérée de 5-Flurouracile (5-FU) administrée par voie systémique [9, 269]. Des résultats similaires ont été observés pour *Clostridium sporogenes* porteur du gène de la nitroréductase (NTR), se résumant en une activité anti-tumorale prolongée et une sécurité d'utilisation satisfaisante [9, 225].

L'insertion du même gène d'*Escherichia coli* codant pour la cytosine déaminase au niveau du plasmide du *Bifidobacterium* a également été réalisée (Figure 25). L'injection des bactéries modifiées associée à l'administration orale de 5-Fluorocytosine (5-FC) a permis l'inhibition de la croissance de cancers du sein chez le rat [8, 270] (Figure 26a). Des résultats similaires ont été obtenus pour des cancers humains greffés chez la souris nude, notamment le cancer du sein KPL-1 et le cancer de l'estomac (Figure 26b) [8].



Concept of cancer treatment by combining the prodrug 5-fluorocytosine (5FC) (given orally), cytosine deaminase of *Escherichia coli* (e-CD)-transformed *Bifidobacterium longum* (i.v.) with 5FU, 5-fluorouracil.

**Figure 25 :** Intégration du gène de la cytosine déaminase dans le plasmide du *Bifidobacterium longum*, et l'utilisation de celui-ci en tant que thérapie antinéoplasique : l'expression de l'enzyme au niveau tumoral permet la conversion de 5-Fluorocytosine inactive administrée par voie orale en 5-Fluorouracile active [8].



Antitumor effects of i.v.-injected cytosine deaminase of *Escherichia coli* (e-CD)-transformed *Bifidobacterium longum* (*B. longum/e-CD*) combined with 5-fluorocytosine (5FC) (given orally). (a) Comparison of the tumor volumes of non-injected rats ( $n = 5$ ) with those of *B. longum/e-CD* i.v. injected rats ( $n = 15$ ). Rats bearing 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors received i.v. *B. longum/e-CD* and 500 mg/kg/day of 5FC. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . (b) Antitumor assessment of *B. longum/e-CD* in nude mice transplanted with KPL-1 human mammary tumor cells. Tumor-bearing nude mice ( $n = 8$ ) were given a dose of transformed bacteria cells i.v. ( $5.9 \times 10^9$  c.f.u./mouse), followed by 5FC (orally) for 21 days.

**Figure 26 :** Effet anti-tumoral de *Bifidobacterium longum* porteur du gène de la cytosine déaminase associé à l'administration orale de 5-Fluorocytosine : Impact sur le volume tumoral de cancer syngénique du sein chez le rat (a) et de cancer humain xéno greffé chez la souris nude (b) [8].

La thymidine kinase de l'herpès simplex virus (HSVTK) est une enzyme possédant la capacité d'activer des analogues nucléosidiques tels que l'acyclovir et le ganciclovir, et qui peut être fonctionnellement exprimée par les bactéries [20, 186, 271, 272]. Ainsi, *Salmonella* exprimant l'enzyme HSVTK fut utilisée pour traiter des mélanomes B16F10 sous-cutanés. La présence du plasmide vecteur réduit l'activité antitumorale innée de *Salmonella*, mais l'adjonction du ganciclovir provoque une réduction du volume tumoral de 2.5 fois supérieure à celle obtenue en son absence [20].

- Avancées récentes dans le domaine :
  - Prodrogues :

Bien que son potentiel thérapeutique ait été démontré par de nombreuses études, la prodrogue CB1954 présente des limitations significatives – notamment sa toxicité hépatique et la diarrhée dose-limitante [273] – qui ont poussé à la recherche et au développement de prodrogues alternatives. Parmi celles-ci la PR-104 [274, 275], qui permet d'améliorer l'effet oncolytique de la Clostridial-Directed Enzyme Prodrug Therapy (CDEPT). Celle-ci est en phase d'essais cliniques Ib chez des patients porteurs de tumeurs solides avancées, et en phase II chez des patients atteints de leucémies aigües réfractaires ou récidivantes (à la date de décembre 2014) (Clinical trial information : NCT01037556 [276]) [277]. Une autre prodrogue prometteuse est la SN 27686 activée par la nitroréductase (NTR) d'*Escherichia coli*, qui montre une sélectivité *in vitro* 4 à 20 fois supérieure à celle de CB1954, ainsi qu'une

efficacité lytique du « bystander effect » de 48% contre seulement 13% pour la CB1954 [1, 278].

○ Enzymes :

Jusqu'en 2006, l'enzyme la plus utilisée était la nitroréductase d'*Escherichia coli* (*nfnB* ou *EcoNTR*), largement inadaptée par rapport au *Clostridium*, notamment du fait de la différence d'usage de codons entre les deux bactéries [1]. Ainsi le développement de formes optimisées du gène *nfnB* associées à l'adjonction de puissants promoteurs permit une bien meilleure expression clostridienne de l'enzyme, résultant en des taux supérieurs de conversion de CB1954 [274]. Une autre technique d'optimisation passait par la modification du site actif de l'enzyme par mutagenèse dirigée, modifiant ainsi son activité catalytique [279, 280]. Ainsi, la nitroréductase optimisée (sNTR) a permis l'obtention *in vivo* d'une activité 20 à 30 fois supérieure [1].

L'efficacité de la production de 5-Fluorouracile (5-FU) par la cytosine déaminase a également été récemment améliorée pour atteindre plus de 100 fois celle du vecteur initial, et ce par le remplacement du 324<sup>ème</sup> acide aminé correspondant à l'Aspartate par l'Alanine au niveau de la région centrale active de l'enzyme [8, 281].

L'optimisation de la nitroréductase et de la cytosine déaminase d'*Escherichia coli* n'empêcha pas la recherche d'autres enzymes qui seraient plus efficaces. Le screening de génomes bactériens permit la mise en évidence d'enzymes ayant une plus grande affinité envers la CB1954 [24]. Ainsi la HinNTR isolée à partir de l'*Haemophilus influenza*, la NmeNTR de *Neisseria meningitidis* ou encore la YfkO nitroréductase du *Bacillus licheniformis* [282]

présentent-elles toutes des propriétés cinétiques supérieures à celles de l'EcoNTR, signifiant une plus efficace conversion de CB1954 [283]. La dernière est particulièrement prometteuse quant à sa potentielle utilisation en CDEPT, du fait de sa production exclusive du dérivé utile 4-hydroxylamine de CB1954, et de sa grande stabilité suggérant une activité oncolytique potentielle prolongée [1].

Le gène *NTR-H* codant pour l'enzyme HinNTR fut optimisé pour les bactéries du genre *Clostridium* et introduit au niveau du *Clostridium sporogenes* [225]. L'administration de la souche obtenue chez les souris nues porteuses de tumeurs HCT116 suivie de l'apport de la prodrogue CB1954 a permis la réduction de la croissance tumorale au point de la stabilisation du volume néoplasique. Le traitement par le même protocole selon des cycles répétés, séparés par des antibiothérapies permettant l'élimination bactérienne, a eu pour résultats le prolongement du temps de dédoublement des tumeurs HCT116 de 7 jours pour les souris de contrôle à 70 jours pour les souris traitées [225].

Le gène de la nitroréductase NmeNTR, après optimisation, a pu être intégré de façon stable directement au génome du *Clostridium sporogenes* par une technique récente dite Allele-Coupled Exchange (ACE) [284, 285]. L'intégration directe dans le génome bactérien éliminant le besoin de l'utilisation de plasmides, permet d'éviter les inconvénients inhérents à celui-ci, à savoir le risque de perte et le risque de dissémination horizontale par transfert [284]. L'administration de la souche recombinante aux souris porteuses de tumeurs HCT116 conduit, après administration de la prodrogue CB1954 à une stabilisation du volume tumoral durant 25 jours, puis à une régression de moitié

de celui-ci dans les jours qui suivent. Cependant, au bout de 40 jours une récurrence tumorale est observée [1, 285].

### **C. Essais cliniques :**

Les études précliniques et cliniques phase I concernant l'usage des bactéries pour le contrôle tumoral furent dans l'ensemble décevantes (Tableau VI), contrairement aux résultats obtenus sur modèles expérimentaux murins. En effet, une revue de la littérature à ce sujet révèle que les résultats de la majorité des essais ne furent jamais publiés, et que certains furent même interrompus avant leur terme. Des investigations sont nécessaires pour définir les causes de ces échecs [3].

**Tableau VI :** Essais cliniques et précliniques concernant la bactériothérapie anti-tumorale.

Species (strain)	Identifier	Tumor (sample size)	Outcome(s)	Effector(s)
<i>C. sporogenes</i> (M55) <sup>a</sup>	-	5 types (1 each) Vascular glioblastoma (49)	Oncolysis, limited utility to treat tumors Oncolysis, tumor recurrence unaffected	Not reported Not reported
<i>C. novyi</i> (NT)	NCT00358397	Solid tumor (20)	Terminated – due to a design problem	-
	NCT01118819	Solid tumor (5)	Terminated – reason(s) not disclosed	-
	NCT01924689	Solid tumor (18)	In progress	Awaited
<i>C. histolyticum</i>	Pre-clinical	6 types (6)	DLT observed. Responders: 5 (stable)	-
	Dog	Soft-tissue sarcoma (12)	Responders: 2 (complete), 3 (partial), 5 (stable)	Not reported
	NCT01613313	Lipoma (14)	Not available and/or published	Not reported
<i>S. Typhimurium</i> (VNP20009)	NCT02249052	Lipoma (20)	In progress	Awaited
	NCT00004216	Metastatic melanoma (24)	Focal tumor colonization in 3 patients	Not applicable
	NCT00004988	Metastatic melanoma (4)	No tumor shrinkage	Not applicable
Mixed Bacterial Vaccine	NCT00006254	Squamous cell carcinoma (3)	Tumor biopsy culture positive in 1 patient	Not applicable
	Pre-clinical	7 types (35)	No tumor shrinkage	Not applicable
	Dog	7 types (35)	Tumor colonization in 2 patients	Not reported
<i>S. Typhimurium</i> ( $\chi$ 4550) <sup>b</sup>	NCT01099631	Hepatocellular carcinoma (22)	Responders: 4 (complete), 2 (partial), 2 (stable) Overall survival was better in complete responders	-
	NCT01486329	Pancreatic cancer (72)	Terminated – reason(s) not disclosed	T <sub>effector</sub> cells?
Mixed Bacterial Vaccine	NCT01486329	Pancreatic cancer (72)	Reduction in tumor perfusion after vaccination. Fate of tumors not disclosed	-
	NCT00623831	Malignant tumors positive for CTAG1B (NY-ESO-1) (17)	Not available and/or published	Not reported

<sup>a</sup> A gram-positive soil-dwelling spore-forming obligate anaerobic non-pathogenic bacterium.

<sup>b</sup> A triple mutant (*asd*, *crp*, *cyd*) secreting human IL2.

<sup>c</sup> A host carrying mammalian expression plasmid for full-length human VEGFR2.

# **| LIMITES ET PERSPECTIVES**

## V. LIMITES ET PERSPECTIVES :

- Réglementation :

Les bactéries oncolytiques, comme toutes les thérapies biologiques vivantes, constituent un défi réglementaire du fait de leur caractère vivant et auto-propagatif [38]. En effet la possibilité de la dispersion dans l'environnement des bactéries, même celles atténuées, à partir du sujet traité est un risque réel [286]. Cette diffusion se fait au travers de pertes (shedding) par le biais d'excrétas (selles), de sécrétas (urines, salive, sécrétions naso-pharyngées...) ou au travers de la peau (plaies, pustules...) [286]. Le risque encouru est d'autant plus important que les germes concernés sont génétiquement modifiés, exposant à la diffusion de souches nouvelles, porteuses dans certains cas de plasmides nouveaux.

Dans ce cadre, il est important de définir un certain nombre des caractéristiques des bactéries utilisées afin de pouvoir estimer le danger potentiel pour l'environnement que pourrait présenter leur utilisation. Parmi ces propriétés, la virulence, la pathogénicité ou la toxicité envers l'Homme, l'animal, les plantes et les autres microbes, la stabilité génétique de la souche et la fréquence de survenue d'échanges génétiques à l'état naturel, ses capacités de survie dans le milieu externe, l'existence d'antibiotiques ou autres biocides permettant le contrôle du germe, ou encore de substrats permettant de limiter sa croissance [287].

Le rapport du germe envers l'environnement qu'il est susceptible de contaminer est également pesant dans cette équation [287] : est-ce que le milieu

en question limite la multiplication de la bactérie ? des barrières naturelles présentes dans le milieu permettraient-elles de circonscrire son extension ? existe-t-il dans cet environnement des espèces proches du germe qui pourraient être affectées ?

L'utilisation de germes génétiquement modifiés constitue une situation extrêmement délicate. L'effet de l'expression des gènes insérés chez une population non initialement ciblée peut être problématique. Aussi, lorsque la séquence génétique modifiée est stable, cela peut conduire à la persistance de la souche nouvelle dans l'environnement, ce qui pourrait avoir de fâcheuses conséquences. Ces souches peuvent notamment être à l'origine de résistances qui pourraient diffuser horizontalement, ou verticalement par multiplication et sélection naturelle [287].

Ainsi, des études concernant les « pertes » (shedding) des microorganismes sont nécessaires pour définir les mécanismes de diffusion impliqués, et évaluer l'ampleur des risques environnementaux encourus en cas de propagation. Les résultats de telles études permettraient de concevoir et de mettre en place des mesures de prévention adaptées avant de s'engager dans l'utilisation effective des germes en tant que traitement [286].

Deux agences fédérales américaines régulent l'usage des technologies biologiques et recombinantes : la Food and Drug Administration (FDA) et l'Office of Biotechnology Activities (OBA) [38]. Divers documents ont été produits par la FDA visant à guider l'utilisation thérapeutique des microorganismes, notamment dans le cadre de la thérapie génique. Parmi ceux-ci : “Guidance for Industry: Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria Based Gene Therapy and Oncolytic Products” et “Guidance for

Industry: Determining the Need for and Content of Environmental Assessments for Gene Therapies, Vectored Vaccines, and Related Recombinant Viral or Microbial Products” [38].

- Toxicité :

La toxicité des bactéries utilisées pour la thérapie antinéoplasique a été le premier des obstacles à dépasser historiquement afin de pouvoir concevoir une utilisation thérapeutique réelle [4, 9, 34]. La production de toxines, le lipopolysaccharide des bactéries gram négatif, la colonisation des tissus sains [8, 9] sont autant de problèmes qui furent résolus par sélection de souches, induction de mutations, ou ADN recombinant. Cependant, ces mesures restent tout de même limitées, et la toxicité induite par le traitement bactérien est aujourd’hui toujours un problème. Des études sont nécessaires dans le sens d’une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité induite et les mécanismes de la destruction tumorale, afin de pouvoir améliorer au mieux l’index thérapeutique de l’approche [38].

- Volume tumoral et vascularisation :

Pour une bactériothérapie efficace, il est nécessaire que les bactéries prolifèrent spécifiquement au niveau tumoral et qu’elles s’y multiplient pour atteindre un nombre suffisant. Ces aspects sont problématiques pour certaines tumeurs, rendant difficile l’obtention de résultats satisfaisants.

En effet, les tumeurs en deçà d'un certain volume présentent une vascularisation relativement saine, assurant une oxygénation homogène du tissu néoplasique et empêchant la constitution du milieu hypoxique favorable au développement des germes [4, 20]. L'augmentation de la taille tumorale s'accompagne de l'apparition d'anomalies vasculaires faisant le lit de paramètres biochimiques et physiologiques adaptés à la prolifération bactérienne [20, 49]. Ainsi, les tumeurs doivent être volumineuses au-delà d'un certain point pour espérer obtenir une efficacité thérapeutique par bactériothérapie [91]. Illustrant cela, les spores de *Clostridium* n'affectent que les tumeurs d'une masse supérieure à 2 à 4 grammes chez la souris [20, 50].

D'autre part, l'accumulation intra-tumorale de certaines bactéries dépend directement de l'importance de la vascularisation néoplasique. Ainsi, l'effet anti-tumoral de *Salmonella typhimurium* A1-R est directement proportionnel à l'importance de la vascularisation de la tumeur [3, 110].

L'augmentation de la masse tumorale améliore l'impact thérapeutique de la bactériothérapie, notamment dans le cadre de la thérapie combinée [91]. Cependant, un volume tumoral trop important constitue également une entrave au bon déroulement thérapeutique. La lyse cellulaire induite par bactériothérapie potentialisée par l'importance du volume néoplasique produit la libération de grandes quantités de métabolites cellulaires – calcium, phosphate, acide urique – réalisant le syndrome de lyse [91, 288]. Aussi, la prolifération des bactéries dans le milieu optimal que constitue la tumeur de grand volume riche en zones hypoxiques et nécrotiques, occasionne une production de substances toxiques bactériennes [91].

Il est donc important de savoir sélectionner les tumeurs aux mensurations idéales pour une bactériothérapie, ou d'adapter la bactériothérapie par quelque moyen aux divers volumes néoplasiques, ce qui équivaldrait à mettre au point une solution permettant de cibler les tumeurs peu vascularisées.

- Persistance de la périphérie oxygénée :

Les bactéries anaérobies utilisées pour la bactériothérapie oncolytique se logent au niveau des zones d'hypoxie et de nécrose tumorales qui sont le plus souvent situées au centre des masses solides. La destruction tissulaire qu'elles y engendrent est importante, mais respecte le plus souvent la périphérie tumorale mieux oxygénée [4, 38, 139]. Cette couronne cellulaire néoplasique persistante est à l'origine de recroissance tumorale et de récives, et constitue une entrave majeure à l'efficacité thérapeutique au long cours de la bactériothérapie lorsqu'utilisée seule [8, 9, 38, 213]. Les mauvais résultats obtenus à long terme restent en effet une des limitations les plus importantes de la bactériothérapie seule [3], comme cela a été démontré pour l'utilisation de *Clostridium butyricum* M-55 chez des patients atteints de glioblastomes [9, 115, 207].

- Hétérogénéité inter-tumorale :

Aussi, tous les types de tumeurs ne sont pas sensibles de manière égale à la bactériothérapie. Le champ d'activité reste en effet à définir, notamment selon le type de germe utilisé, les différentes voies d'administration et les différentes stratégies [91].

- L'immunisation préexistante contre les bactéries :

Dans certains cas, la présence d'anticorps circulants dirigés contre la bactérie oncolytique peut limiter son intérêt thérapeutique [4, 289]. Chez les sujets immunisés, l'activité antibactérienne limite la colonisation et l'importance de la prolifération intra-tumorale. Cela a pu être démontré in vitro pour *Salmonella* : le sérum contenant les immunoglobulines spécifiques empêche la colonisation cellulaire [192, 290]. Sur modèle murin, l'immunisation par administration de *Salmonella typhimurium* inactivée empêche la survenue de toute activité oncolytique suite au traitement [3, 4, 192, 290]. Chez l'Homme, la colonisation tumorale par *Salmonella* après administration systémique est impossible lorsque les patients sont préalablement immunisés [4, 192].

Le problème est d'autant plus éminent que les germes sont ubiquitaires. Dans un tel cas, le contact préalable avec le germe et le développement conséquent d'une immunité spécifique est difficilement évitable, ce qui peut conduire à l'échec thérapeutique dès la première administration bactérienne [4].

Des solutions pour la neutralisation bactérienne immunitaire furent envisagées, comme l'adjonction d'un polymère permettant de masquer l'immunogénicité des microorganismes [4].

- Limites des techniques de modification génétique :

De nouvelles techniques et de nouvelles stratégies furent imaginées et développées afin d'améliorer l'efficacité de la bactériothérapie. Elles sont

essentiellement basées sur la modification génétique de différentes souches, dans un but d'atténuation de toxicité ou d'addition d'effets thérapeutiques complémentaires. Cependant, bien que prometteuse et ouvrant la voie à diverses stratégies novatrices, l'altération génétique présente certains inconvénients qui pourraient remettre en cause son utilisation, notamment lorsque l'organisme produit est destiné aux traitements à grande échelle.

En effet, les techniques destinées à produire des souches moins pathogènes peuvent se voir grever de réversions vers les phénotypes sauvages. Ce phénomène a été observé pour les bactéries du genre *Clostridium* et *Salmonella* [8].

Aussi, les mécanismes d'altération génétique des souches bactériennes étant des processus complexes, il n'est pas impensable de produire des phénotypes inattendus qui pourraient limiter l'efficacité thérapeutique [38], ou pis encore, des souches porteuses de résistances nouvelles envers les antibiotiques.

Une technique spécifique particulièrement décrite est celle basée sur la modification et l'insertion de plasmides. En effet, ils sont naturellement impliqués dans la transmission horizontale de facteurs de virulence et de résistances, offrant potentiellement un moyen de diffusion important à toute erreur de conception plasmidique. D'autre part, leur caractère instable signifie la possibilité de disparition des gènes insérés au décours de la multiplication bactérienne, ce qui ferait perdre tout son intérêt à la technique [9].

Des techniques de manipulation génétique nouvelles et plus efficaces seraient donc nécessaires [9].

- Manipulation génétique basée sur les introns du groupe II :

Un intron est une portion d'ADN théoriquement non codante située entre deux exons. Un intron est excisé lors de l'épissage de l'ARN, et seul les exons persistent et sont traduits par la suite. Les introns du groupes II sont des éléments génétiques de découverte récente possédant la capacité de s'exciser et de se réinsérer dans le génome de façon autonome, contrairement aux introns du groupe I. Ils furent initialement mis en évidence dans le génome des mitochondries et des chloroplastes des eucaryotes inférieurs. Le premier intron du groupe II bactérien fut découvert en 1993 [9, 291].

Les introns du groupe II codent pour une enzyme dite Intron Encoded Protein (IEP) caractérisée par des fonctions faisant toute la particularité de ces introns. Elle promeut l'excision autonome de l'intron, mais également son insertion au niveau de zones cibles de l'ADN par un phénomène dit de « retro-homing » [292]. En effet, l'IEP permet la reconnaissance de portions d'ADN fixes flanquant la zone cible – qui est constituée de 14 à 16 nucléotides – ce qui permet à l'ARN de l'intron de se fixer à celle-ci par appariement de base [293, 294]. L'IEP procède ensuite à la rétro-transcription de l'ARN et à l'insertion de l'ADN résultant, ce qui provoque l'inactivation du gène ciblé [9].

Le système de ciblage de gène étant basé sur l'appariement de bases, la modification de l'ADN codant pour l'intron de groupe II permet de redéfinir la cible de celui-ci sans restriction. La précision de ciblage de cette approche n'a d'égal dans les autres systèmes de rétro-transcription, viraux inclus, qui insèrent les fragments d'information génétique dans des localisations aléatoires [9].

Le fait que le nécessaire pour l'excision et la réinsertion ciblée soit presque entièrement codé dans l'intron lui-même lui confère une indépendance fonctionnelle vis-à-vis de l'hôte. Ainsi, les introns du groupe II peuvent être utilisés pour l'insertion de gènes quelles que soient les fonctions recombinantes que possède l'hôte [9, 295-297].

Le système possède en outre une haute fréquence de transferts, un vaste panel d'hôtes potentiels incluant aussi bien des organismes simples que d'autres supérieurs, et offre une large gamme d'applications possibles [9].

Toutes ces caractéristiques des introns du groupe II en font un excellent moyen de modification génétique bactérienne [9, 298, 299]. Il a pu être adapté à l'usage sur les bactéries du genre *Clostridium* selon ce qui fut nommé le système ClosTron [300]. Celui-ci se base sur l'utilisation de vecteurs appelés « targetrons » et permet l'inactivation de gènes (gene knock-out) ainsi que leur insertion (gene knock-in) de façon efficace, reproductible et stable, ouvrant ainsi la porte à des possibilités de remaniement génétique inédites [9].

La réduction de la toxicité bactérienne, l'amélioration de la spécificité du ciblage tumoral par les bactéries, la stimulation du système immunitaire de l'hôte et l'activation de l'immunité anti-tumorale [9], sont toutes autant de voies d'optimisation de la bactériothérapie qu'offre cette nouvelle technologie, qui, sans nul doute, ne saurait tarder à élargir son spectre aux autres genres bactériens, et qui pourrait enfin permettre d'exprimer tout le potentiel de la bactériothérapie oncolytique, notamment en termes de thérapie génique [3].

- Cellules souches tumorales, hétérogénéité intra-tumorale, immunité anti-tumorale :

Les cellules souches tumorales sont des cellules qui possèderaient des caractéristiques semblables à celles des cellules souches normales : elles seraient capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à divers types cellulaires. Elles seraient ainsi responsables de l'hétérogénéité intra-tumorale – l'un des plus grands obstacles à l'oncothérapie – et seraient impliquées dans la survenue des métastases et des récives tumorales. La destruction de ce contingent cellulaire pourrait donc faire toute la différence dans la recherche de la rémission complète et définitive. Dans ce sens, des efforts sont fournis pour le développement de solutions permettant le ciblage spécifique de ces cellules, et pourraient sans aucun doute profiter des opportunités offertes par la bactériothérapie [8].

Aussi, une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire de l'organisme dans son activité anti-tumorale, et des mécanismes d'échappement immunitaire des cellules néoplasiques semble être une voie de passage obligatoire pour atteindre la thérapie qui pourrait finalement prétendre guérir définitivement le cancer. Dans cette optique, il pourrait s'avérer intéressant d'explorer le pan immunologique sombre que représente l'absence de réaction immunitaire face au *Bifidobacterium longum* et la difficulté de l'organisme à le reconnaître comme antigène exogène [8].

# **| CONCLUSION**

## VI. CONCLUSION :

Les cancers peuvent être décrits comme étant la pathologie du siècle sans réelle crainte de se voir contredire. Les conséquences du cancer sont énormes à tout point de vue, aussi bien humain, social que financier. Une solution thérapeutique réellement efficace tarde cependant à voir le jour malgré l'intensité de la recherche scientifique et le volume financier investis. Les thérapies classiques se sont rapidement vu limitées par leur propre toxicité.

La bactériothérapie oncolytique vient dans ce contexte offrir une lueur d'espoir. En effet, depuis plusieurs siècles déjà, les bactéries ont démontré leur effet bénéfique sur le développement tumoral, et les premières tentatives d'usage thérapeutique de celles-ci datent du XIX<sup>ème</sup> siècle.

Depuis, bien des étapes ont été franchies, et aujourd'hui, la bactériothérapie représente sans nul doute l'une des thérapies antinéoplasiques les plus prometteuses. Grâce à ses capacités de ciblage spécifique, les possibilités innombrables offertes par les techniques génétiques actuelles, la relative simplicité de manipulation en comparaison à d'autres microorganismes, la bactériothérapie détient un potentiel fabuleux. Notamment, l'avènement de la thérapie génique et son association à la bactériothérapie a permis d'ouvrir de nouveaux horizons, laissant entrevoir peut-être enfin la solution thérapeutique tant attendue.

Un jour peut-être, lorsque les capacités de ciblage tumoral seront affûtées et dépasseront les limites liées au volume et à la vascularisation tumoraux, et que la bactériothérapie pourra enfin cibler et détruire les cellules souches

tumorales, ce jour-là verra peut-être la bactériothérapie non pas traiter le cancer, mais le prévenir à la façon d'une vaccination qui éliminerait les cellules malignes avant même la constitution de tumeurs véritables.

# | **RESUMES**

## RESUME :

**Titre :** Bactériothérapie oncolytique.

**Auteur :** Mohamed-Taha Tagmouti.

**Directeur de thèse :** Pr. Sakina El Hamzaoui.

**Mots clés :** Bactériothérapie oncolytique, Thérapie combinée, Thérapie génique, Mécanismes, Salmonella, Clostridium.

Les premiers rapports évoquant l'activité antinéoplasique bactérienne remontent au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle. La succession d'observations similaires au cours des deux siècles suivants conduisit aux premières initiatives utilisant les bactéries comme thérapie anticancéreuse. Les premiers résultats étant décevants, la radiothérapie et la chimiothérapie firent rapidement oublier la bactériothérapie. L'intérêt pour celle-ci fut ravivé récemment par l'avènement des nouvelles techniques de modification génétique.

Les bactéries utilisées pour la thérapie antinéoplasique sont les bactéries anaérobies, qui se logent spécifiquement au niveau tumoral – et c'est l'un des grands atouts de la bactériothérapie – grâce à la présence de zones d'hypoxie et de nécrose, de nutriments particuliers, et à l'inaccessibilité du tissu tumoral au système immunitaire entre autres. La destruction tumorale engendrée est secondaire à l'activité bactérienne propre associée à l'activité du système immunitaire initiée par les germes.

La bactériothérapie oncolytique était initialement basée sur l'usage des bactéries seules, mais l'insuffisance de l'efficacité obtenue a motivé le développement de nouvelles stratégies adjoignant les thérapies anticancéreuses classiques, et plus récemment la thérapie génique. Des résultats prometteurs furent obtenus, et la marge d'évolution reste large.

Bien que présageant un avenir radieux à la thérapie anticancéreuse, la bactériothérapie présente cependant des limitations nombreuses, aussi bien techniques que cliniques, passant par la toxicité toujours importante malgré les efforts fournis, l'obstacle que constitue l'hétérogénéité tumorale, les difficultés régulatrices, et les risques environnementaux. Le développement de techniques génétiques nouvelles pourrait néanmoins lever ces obstacles.

## ABSTRACT

**Title :** Oncolytic Bacteriotherapy.

**Author :** Mohamed-Taha Tagmouti.

**Supervisor :** Pr. Sakine El Hamzaoui.

**Keywords :** Oncolytic bacteriotherapy, Combined therapy, Gene therapy, Mecanisms, Salmonella, Clostridium.

The first reports of the beneficial activity of bacteria on neoplasms came at the beginning of the 18<sup>th</sup> century. Numerous similar observations followed through the next two centuries, leading to the very first therapeutic trials of bacteria as anticancer drugs. The unsatisfying results that emerged from these trials allowed an emerging chemotherapy and radiotherapy to dominate as reference anticancer therapies, while bacteriotherapy was forgotten. Recently, the development of novel genetic alteration techniques brought attention back to bacteria.

The anaerobic bacteria used to treat cancer specifically target tumor tissue – which is one of the great advantages of such an approach – due to the presence of hypoxic and necrotic regions, specific nutrients, and to the protection that such an environment confers from the immune system activity. The destruction that occurs comes from the direct bacterial activity and that of the stimulated immune system.

Oncolytic bacteriotherapy initially used bacteria alone. The insufficient results obtained motivated the development of new strategies, including the adjunction of the classical anticancer therapies and, more recently, the association to gene therapy. Very promising results occurred, and the margin of evolution of these approaches remains wide.

A bright future for cancer therapy is foreseeable through bacteriotherapy. Nonetheless, many limitations still remain, including bacterial toxicity, tumor heterogeneity, regulation challenges, and possible environmental impact. Recently developed techniques of genetic alteration might resolve these problems.

## ملخص

**العنوان:** العلاج الباكثيري الحال للورم.

**الكاتب:** محمد طه التغموتي.

**المشرف:** ذ. سكيينة الحمزاوي.

**الكلمات الأساسية:** العلاج بالباكتيريا الحالة للورم، الجمع بين العلاج، العلاج الجيني، آليات، سالمونيللا، كلوستريديوم.

أول التقارير المشيرة إلى مفعول البكتيريا الحال لأورام تعود لأوائل القرن الثامن عشر. توالي ملاحظات مشابهة خلال القرنين المواليين أدى إلى أولى المبادرات باستخدام البكتيريا كعلاج ضد السرطان. النتائج الأولية كانت مخيبة للآمال، مما سهل ارتقاء العلاج الإشعاعي و الكيميائي كالعلاج الأساسي ضد السرطان، على حساب العلاج بالبكتيريا الذي تم نسيانه. تمت إعادة الإهتمام بهذا الأخير بعد ظهور التقنيات الجديدة للتعديل الوراثي.

البكتيريا المستخدمة لعلاج الأورام هي البكتيريا الاهوائية. لها خاصية النمو في النسيج الورمي دون غيره، و ذلك راجع إلى وجود مناطق نقص الأوكسجة و مناطق نخر، و كذا إلى وجود مواد غذائية خاصة، و إلى صعوبة اختراق الجهاز المناعي للنسيج الورمي، و غيرها من الأسباب. الدمار الذي يلحق بالورم ينتج عن النشاط الباكثيري المباشر و عن مفعول جهاز المناعة المحفّز من طرف الجراثيم.

إعتمد علاج الأورام بالبكتيريا بداية على إستخدام البكتيريا وحدها، لكن الفعالية الغير الكافية دفعت إلى تطوير استراتيجيات جديدة تجمع بين البكتيريا الحالة للأورام و علاجات السرطان الكلاسيكية، ومؤخرا بينها و بين العلاج الجيني. و قد تم الحصول على نتائج واعدة، و هامش التطور لا يزال واسعا.

رغم المستقبل المشرق المتوقع في علاج الأورام، يبقى للعلاج بالبكتيريا العديد من العوائق التقنية و السريرية، منها سمية البكتيريا المستعملة، عدم تجانس الأورام، الصعوبات التقنية و المخاطر البيئية. تطوير تقنيات جينية جديدة قد يمكن من تجاوز هاته العقبات.

**| REFERENCES**  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Kubiak AM, Minton NP: **The potential of clostridial spores as therapeutic delivery vehicles in tumour therapy.** *Res Microbiol* 2015, **166**(4):244-254.
2. Tirandaz H, Mohammadi E: **Efficient tumor targeting by anaerobic butyrate-producing bacteria.** *Med Hypotheses* 2013, **80**(5):675-678.
3. Nallar SC, Xu DQ, Kalvakolanu DV: **Bacteria and genetically modified bacteria as cancer therapeutics: Current advances and challenges.** *Cytokine* 2016.
4. Lee C-H: **Engineering bacteria toward tumor targeting for cancer treatment: current state and perspectives.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **93**(2):517-523.
5. Post A: **Environmental exposure to bacteria and viruses may provide oncolytic protection against cancers, and declining exposure to infections may contribute to a rising incidence of cancer.** *Med Hypotheses* 2007, **68**(3):558-561.
6. Webb HE, Smith CEG: **Viruses in the treatment of cancer.** *The Lancet* 1970, **295**(7658):1206-1209.
7. Csatory L: **Viruses in the treatment of cancer.** *The Lancet* 1971, **298**(7728):825.

8. Taniguchi S, Fujimori M, Sasaki T, Tsutsui H, Shimatani Y, Seki K, Amano J: **Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria.** *Cancer Sci* 2010, **101**(9):1925-1932.
9. Wei MQ, Mengesha A, Good D, Anne J: **Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era.** *Cancer Lett* 2008, **259**(1):16-27.
10. Nowotny A: **Antitumour effects of endotoxins.** In *Handbook of endotoxin, cellular biology of endotoxin.* Edited by Berry LJ. New York: Elsevier Science Inc.; 1985.
11. Rohdenburg GL: **Fluctuation in the growth energy of malignant tumors in man, with especial reference to spontaneous recession.** *Journal of Cancer Research* 1918(3):193-225.
12. Everson TC, Cole WH: **Spontaneous regression of cancer, preliminary report.** *Annals of Surgery* 1956, **144**(3):366-380.
13. Challis GB, Stam HJ: **The Spontaneous Regression of Cancer: A review of cases from 1900 to 1987.** *Acta Oncologica* 2009, **29**(5):545-550.
14. Cole WH: **Efforts to explain spontaneous regression of cancer.** *Journal of Surgical Oncology* 1981, **17**(3):201-209.
15. Boyd W: **The spontaneous regression of cancer:** CC Thomas; 1966.

16. Stephenson Jr H, Delmez J, Renden D, Kimpton R, Todd P, Charron T, Lindberg D: **Host immunity and spontaneous regression of cancer evaluated by computerized data reduction study.** *Surgery, gynecology & obstetrics* 1971, **133**(4):649-655.
17. **Query 2004. ‘case report’[all fields] and (‘spontaneous resolution’[all fields] or ‘spontaneous regression’[all fields] or ‘spontaneous remission’[all fields]) and (‘carcinoma’[mesh terms] or carcinoma[text word]) or tumour[text word] or tumour[text word] or ‘neoplasms’[mesh terms] or cancer[text word]) and (‘1987’[pdat] ‘2003’[pdat]), PubMed 2004.**
18. Nauts HC, Swift WE, Coley BL: **The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research.** *Cancer Research* 1946, **6**:205-216.
19. Nauts HC, Fowler GA, Bogatko FH: **A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man.** *Acta Med Scand* 1953, **145**(1).
20. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D: **Bacteria as tumour-targeting vectors.** *The Lancet Oncology* 2003, **4**(9):548-556.
21. McCarthy EF: **The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas.** *The Iowa Orthopedic Journal* 2006, **26**:154-158.

22. Deidier A: **Dissertation Medicinale et Chirurgicale sur les Tumeurs.** Paris; 1725.
23. Hall S: **A Commotion in the Blood.** New York: Henry Holt and Company; 1998.
24. Minton NP: **Clostridia in cancer therapy.** *Nature Reviews Microbiology* 2003, **1(3):**237-242.
25. Coley WB: **Contribution to the Knowledge of Sarcoma.** *Annals of Surgery* 1891, **14(3):**199-220.
26. Coley WB: **The late results of the treatment of inoperable sarcoma by the mixed toxins of erysipelas and Bacillus prodigiosus.** *The American Journal of the Medical Sciences* 1906, **131:**375-430.
27. Blaser MJ: **Not all Helicobacter pylori strains are created equal: should all be eliminated?** *The Lancet* 1997, **349(9057):**1020-1022.
28. Nersesyan AK: **Vaccines against dangerous infections and cancer.** *The Lancet Oncology* 2002, **3(6):**331.
29. Nersesyan A, Mkrtchian L: **P XIII. 103-P XIII. 103 The influence of anthrax vaccine on mutagenesis.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1997, **379(1):**S117.

30. Nersesyan A, Zilfian V, Koumkoumadjian V: **The effect of tularemia vaccine on DMBA-induced rat tumors.** *Anticancer Research* 1990, **10**:1454-1455.
31. *Proceedings of the XVI International Cancer Congress Free Papers and Posters Bologna, Italy: Monduzzi Editore: 1994; 1994: 99-102.*
32. Adamyan R: **Means for use in complex treatment of patients with lung and corpus uteri cancer.** *Patent of Russian Federation* 1997(2092186).
33. Busch W: **Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867.** *Berl Klin Wochenschr* 1868, **5**:137.
34. Oelschlaeger TA: **Bacteria as tumor therapeutics?** *Bioengineered Bugs* 2010, **1**(2):146-147.
35. Fehleisen F: **Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen.** *Dtsch Med Wochenschr* 1882, **8**:553-554.
36. Fehleisen F: **Die Aetiologie des Erysipels.** Berlin: Theodor Fischer; 1883.
37. Coley W: **The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas, With a report of ten original cases.** *Clinical Orthopedics and related research* 1991, **262**:3-11.

38. Staedtke V, Roberts NJ, Bai R-Y, Zhou S: **Clostridium novyi-NT in Cancer Therapy**. *Genes & Diseases* 2016.
39. Coley WB: **A preliminary note on the treatment of inoperable sarcoma by the toxic products of erysipelas**. *The Post-Graduate* 1893, **8**:278-286.
40. Coley WB: **Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus**. *The American Journal of the Medical Sciences* 1894, **108**(1):50-66.
41. Coley WB: **Treatment of inoperable malignant tumours with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus**. *Trans Am Surg Ass* 12 1894:183-212.
42. Parker RC, Plummer HC, Siebenmann CO, Chapman MG: **Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumours**. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1947, **66**(2):461-467.
43. Malmgren RA, Flanigan CC: **Localization of the vegetative form of Clostridium tetani in mouse tumors following intravenous spore administration**. *Cancer Research* 1955, **15**(7):473-478.
44. Carey RW, Holland JF, Whang HY, Neter E, Bryant B: **Clostridial oncolysis in man**. *European Journal of Cancer (1965)* 1967, **3**(1):47-46.

45. Connel HC: **The Study and Treatment of Cancer by Proteolytic Enzymes: Preliminary Report.** *Canadian Medical Association Journal* 1935, **33**(4):364-370.
46. Gericke D, Engelbart K: **Oncolysis by clostridia. II. experiments on a tumor spectrum with a variety of clostridia in combination with heavy metal.** *Cancer Research* 1964, **24**:217-221.
47. Möse JR, Möse G: **Oncolysis by Clostridia. I. Activity of Clostridium butyricum (M-55) and other nonpathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma.** *Cancer Research* 1964, **24**:212-216.
48. Thiele EH, Arison RN, Boxer GE: **Oncolysis by Clostridia. III. Effects of clostridia and chemotherapeutic agents on rodent tumors.** *Cancer Research* 1964, **24**:222-233.
49. Thiele EH, Arison RN, Boxer GE: **Oncolysis by clostridia. IV. Effect of nonpathogenic clostridia spores in normal and pathological tissues.** *Cancer Research* 1964, **24**:234-238.
50. Engelbart K, Gericke D: **Oncolysis by clostridia. V. Transplanted tumors of the hamster.** *Cancer Research* 1964, **24**:239-242.
51. Morales A, Eidinger D, Bruce AW: **Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder tumors (1976).** *The Journal of Urology* 2002, **167**(2):891-894.

52. Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T, Kohjimoto Y, Uekado Y, Shinka T: **Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy.** *Int J Urol* 2007, **14**(2):140-146.
53. Bohle A, Brandau S: **Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer.** *J Urol* 2003, **170**(3):964-969.
54. Avogadri F, Mittal D, Saccheri F, Sarrafiore M, Ciocca M, Larghi P, Orecchia R, Rescigno M: **Intra-tumoral Salmonella typhimurium induces a systemic anti-tumor immune response that is directed by low-dose radiation to treat distal disease.** *Eur J Immunol* 2008, **38**(7):1937-1947.
55. Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, Baba T: **Selective localization and growth of Bifidobacterium bifidum in mouse tumors following intravenous administration.** *Cancer Research* 1980, **40**(6):2061-2068.
56. Albini A, Sporn M: **The tumour microenvironment as a target for chemoprevention.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:139-147.
57. Sung S, Hsieh C, Wu D, Chung L, Johnstone P: **Tumor microenvironment promotes cancer progression, metastasis, and therapeutic resistance.** *Curr Probl Cancer* 2007, **31**:36-100.

58. Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, Bentley B, Forbes NS: **In tumors Salmonella migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis.** *Cancer Gene Ther* 2011, **18**(7):457-466.
59. Ishibashi N, Yaeshima T, Hayasawa H: **Bifidobacteria: their significance in human intestinal health.** *Mal J Nutr* 1997, **3**:149-159.
60. Sekine K, Ohta J, Onishi M, Tatsuki T, Shimokawa Y, Toida T, Kawashima T, Hashimoto Y: **Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of Bifidobacterium infantis.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1995, **18**(1):148-153.
61. Rhee YK, Bae EA, Kim SY, Han MJ, Choi EC, Kim DH: **Antitumor activity of Bifidobacterium spp. isolated from a healthy Korean.** *Archives of Pharmacal Research* 2000, **23**(5):480-487.
62. Bacon GA, Burrows TW, Yates M: **The effects of biochemical mutation on the virulence of bacterium typhosum: the loss of virulence of certain mutants.** *British Journal of Experimental Pathology* 1951, **32**(2):85-96.
63. Bacon GA, Burrows TW, Yates M: **The effects of biochemical mutation on the virulence of Bacterium typhosum: the virulence of mutants.** *British Journal of Experimental Pathology* 1950, **31**(6):714-724.

64. Bacon GA, Burrows TW, Yates M: **The effects of biochemical mutation on the virulence of bacterium typhosum: the induction and isolation of mutants.** . *British Journal of Experimental Pathology* 1950, **31**(6):703-713.
65. Miller SI, Loomis WP, Alpuche-Aranda C, Behlau I, Hohmann E: **The PhoP virulence regulon and live oral Salmonella vaccines.** *Vaccine* 1993 **11**(2):122-125.
66. Graham F, Coleman P: **Infection of a secondary carcinoma by Salmonella montevideo.** *BMJ* 1952, **1**:1116.
67. Giel C: **Abscess formation in a pheochromocytoma - Report of a Case Due to Salmonella typhimurium.** *New Engl J Med* 1954, **251**:980-982.
68. Gill G, Holden A: **A malignant pleural effusion infected with Salmonella enteritidis.** *Thorax* 1996, **51**:104-105.
69. Johnson P, JT JM: **Commentary: Pleural empyema and malignancy- Another direction.** *Thorax* 1996, **51**:107-108.
70. Hensel M: **Salmonella pathogenicity island 2.** *Molecular Microbiology* 2000, **36**(5):1015-1023.
71. Hensel M, Shea JE, Waterman SR: **Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity**

- island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages.** *Molecular Microbiology* 1998, **30**(1):163-174.
72. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW: **Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(6):2593-2597.
73. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA: **Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(15):7800-7804.
74. Finlay BB, Brumell JH: ***Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 2000, **355**(1397):623-631.
75. Salama N, Falkow S: **Genomic clues for defining bacterial pathogenicity.** *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1999, **1**(8):615-619.
76. Bowe F, Lipps C, Tsolis R, Groisman E, Heffron F, Kusters J: **At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice.** *Infection and Immunity* 1998, **66**(7):3372-3377.
77. Groisman E, Ochman H: **How *Salmonella* became a pathogen.** *Trends in Microbiology* 1997, **5**(9):343-349.

78. Pawelek JM, Sodi S, Chakraborty AK, Platt JT, Miller S, Holden DW, Hensel M, Low KB: **Salmonella pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice.** *Cancer Gene Ther* 2002, **9**(10):813-818.
79. Cirillo D, Valdivia R, Monack D, Falkow S: **Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival.** *Molecular Microbiology* 1998, **30**(1):175-188.
80. Lostroh C, Bajaj V, Lee C: **The cis requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI 1. .** *Molecular Microbiology* 2000, **37**(2):300-315.
81. Galan J, Curtiss Rr: **Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(16):6383-6387.
82. Lucas R, Lee C: **Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in Salmonella typhimurium.** *Molecular Microbiology* 2000, **36**(3):1024-1033.
83. Hensel M, Shea J, Raupach B, Monack D, Falkow S, Gleeson C, Kubo T, Holden D: **Functional analysis of ssaJ and the ssaKU operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of Salmonella pathogenicity island 2.** *Molecular Microbiology* 1997, **24**(1):155-167.

84. Deiwick J, Nikolaus T, Shea J, Gleeson C, Holden D, Hensel M: **Mutations in Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI2) Genes Affecting Transcription of SPI1 Genes and Resistance to Antimicrobial Agents.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180**(18):4775-4780.
85. Wilson R, Ballantyne C, Smith C, al. e: **Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation.** *J Immunol* 1993, **151**:1571-1578.
86. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumlert A, al. e: **Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes.** *Nature* 1999, **401**:804-808.
87. Uchiya K-i, Barbieri M, Funato K, al. e: **A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking.** *EMBO J* 1999, **18**:3924-3933.
88. Johnson EA: **Clostridia.** In *Encyclopedia of Microbiology* 3rd edn; 2009: 87-93.
89. Sporn M: **The war on cancer.** *Lancet* 1996, **347**:1377-1381.
90. Chada M: **Cancers: solid tumor.** In *Stem cell network*. Edited by Willemse L; 2013.

91. Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B: **Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:15155-15160.
92. Bustuoabad O, Ruggiero R, Gianni Pd, Lombardi M, Belli C, Camerano G, al. e: **Tumor transition zone: a putative new morphological and functional hallmark of tumor aggressiveness.** *Oncol Res* 2005, **15**:196-182.
93. Graeber T, al. e: **Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours.** *Nature* 1996, **379**:88-91.
94. Lee CH, Wu CL, Tai YS, Shiau AL: **Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* in combination with cisplatin for cancer therapy.** *Mol Ther* 2005, **11**(5):707-716.
95. Cairns R, Papandreou I, Denko N: **Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment.** *Mol Cancer Res* 2006, **4**:61–70.
96. Jain R, Forbes N: **Can engineered bacteria help control cancer?** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:14748–14750.
97. Weinmann M, Belka C, Plasswilm L: **Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours.** *Onkologie* 2004, **27**:83-90.

98. Minchinton A, Tannock I: **Drug penetration in solid tumours.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:583–592
99. Vaupel P, Harrison L: **Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response.** *Oncologist* 2004, **9** (Suppl5):4-9.
100. Yu J, Rak J, Coomber B, Hicklin D, Kerbel R: **Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy.** *Science* 2002, **295**:1526-1528.
101. Nordsmark M, Bentzen S, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, al. e: **Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study.** *Radiother Oncol: J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2005, **77**:18-24.
102. Brown J, Giaccia A: **The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy.** *Cancer Res* 1998, **58**:1408-1416.
103. Yu Y, Shabahang S, Timiryasova T, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I, al. e: **Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:313–320.

104. Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, Oelschlaeger TA, Goebel W, Szalay AA: **Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in live mice.** *Int J Med Microbiol* 2007, **297**(3):151-162.
105. Cummins J, Tangney M: **Bacteria and tumours: causative agents or opportunistic inhabitants?** *Infect Agents Cancer* 2013, **8**:11.
106. Clairmont C, Lee K, Pike J, Ittensohn M, Low K, Pawelek J, al. e: **Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium.** *J Infect Dis* 2000, **181**:1996–2002.
107. Forbes N, Munn L, Fukumura D, Jain R: **Sparse initial entrapment of systemically injected Salmonella typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors.** *Cancer Res* 2003, **63**:5188-5193.
108. Zhao M, Yang M, Li X, Jiang P, Baranov E, Li S, al. e: **Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:755–760.
109. Zhao M, Yang M, Ma H, Li X, Tan X, Li S, al. e: **Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice.** *Cancer Res* 2006, **66**:7647–7652.

110. Liu F, Zhang L, Hoffman RM, Zhao M: **Vessel destruction by tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R is enhanced by high tumor vascularity.** *Cell Cycle* 2010, **9**:4518–4524.
111. Kasinskas RW, Forbes NS: **Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**(4):710-721.
112. Sun J, Gunzer F, Westendorf A, Buer J, Scharfe M, Jarek M, Gossling F, Blocker H, Zeng A: **Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic E. coli strain Nissle 1917 inferred from raw genome data.** *J Biotechnol* 2005, **117**:147–161.
113. Altenhöfer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Ölschläger T: **The probiotic E. coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004, **40**:223–229.
114. Paton AW, Morona R, Paton JC: **Bioengineered microbes in disease therapy.** *Trends Mol Med* 2012, **18**(7):417-425.
115. Heppner F, Mose JR: **The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic Clostridium.** *Acta Neurochir* 1978, **42**:123–125.

116. Kasinskas R, Forbes N: **Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis.** *Cancer Res* 2007, **67**:3201–3209.
117. Möse J: **Zur Beeinflussbarkeit verschiedener Tiertumoren durch einen apathogenen Clostridienstamm.** *Zeitschrift für Krebsforschung* 1960, **63**(5):447-455.
118. Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galan JE: **A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy.** *J Cell Biol* 2003, **163**(5):1123-1131.
119. Kim B, Forbes N: **Single-cell analysis demonstrates how nutrient deprivation creates apoptotic and quiescent cell populations in tumor cylindroids.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **101**:797–810.
120. Galan JE: **Molecular and cellular basers of Salmonella entry into non-phagocytic cells.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1995, **209**:43-60.
121. Galan JE: **Molecular bases of Salmonella entry into host cells.** *Mol Microbiol* 1996, **20**:263-271.
122. Ginocchio C, Olmsted SB, Wells CL, Galan JE: **Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on Salmonella typhimurium.** *Cell* 1994, **76**:717-724.

123. Zieler M, Galan JE: **Contact with cultured epithelial cells induces the secretion of the Salmonella typhimurium protein InvJ.** *Infect Immun* 1995, **63**:4024-4028.
124. Chen LM, Kaniga K, Galan JE: **Salmonella spp are cytotoxic for cultured macrophages.** *Molecular Microbiology* 1996, **21**(5):1101-1115.
125. Zychlinsky A, Sansonetti PJ: **Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death?** . *Trends Microbiol* 1997, **5**:201-204.
126. Lindgren SW, Heffron F: **To sting or be stung: bacteria-induced apoptosis.** *Trends Microbiol* 1997, **5**:263–264.
127. Boise LH, Collins CM: **Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?** *TRENDS in Microbiology* 2001, **9**(2):64-67.
128. Bannerman DD, Tupper JC, Ricketts WA, Bennett CF, Winn RK, Harlan JM: **A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 2001, **276**:14924 – 14932.
129. Spenser T, Lehniger A: **L-Lactate transport in Ehrlich ascites-tumour cells.** *Biochem J* 1976, **154**:405–414.

130. Payne AG: **Exploiting hypoxia in solid tumors to achieve oncolysis.** *Med Hypotheses* 2007, **68**(4):828-831.
131. Bettegowda C, Huang X, Lin J, al. e: **The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent Clostridium novyi-NT.** *Nature biotechnology* 2006, **24**(12):1573-1580.
132. Pardoll D: **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** *Nature reviews* 2012, **12**(4):252-264.
133. Chen L, Flies D: **Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and coinhibition.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(4):227-242.
134. Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison J: **Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections.** *Immunological reviews* 2009, **229**(1):67-87.
135. Lippitz B: **Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review.** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(6):e218-228.
136. Nagaraj S, Youn J, Gabrilovich D: **Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells.** *Journal of immunology* 2013, **191**(1):17-23.

137. Kaufman H, Kohlhapp F, Zloza A: **Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs.** *Nature reviews Drug discovery* 2015, **14**(9):642-662.
138. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, al. e: **Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma.** *Cancer research* 2012, **72**(10):2609-2621.
139. Rosenberg S, Spiess P, Kleiner D: **Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated Salmonella typhimurium.** *J Immunother* 2002, **25**:218–225.
140. Lee C, Wu C, Shiau A: **Salmonella choleraesuis as an anticancer agent in a syngeneic model of orthotopic hepatocellular carcinoma.** *Int J Cancer* 2008, **122**:930–935.
141. Staedtke V, Bai R, Sun W, al. e: **Clostridium novyi-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats.** *Oncotarget* 2015, **6**(8):5536-5546.
142. Agrawal N, Bettegowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi M, Dang LH, Diaz LA, Jr., Pomper M *et al*: **Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(42):15172-15177.

143. Krzykawski MP: **Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy.** *Cent Eur J Immunol* 2015, **40**(3):366-372.
144. Huang T, Li S, Li G, al. e: **Utility of Clostridium difficile toxin B for inducing anti-tumor immunity.** *PloS one* 2014, **9**(10):e110826.
145. Zbar B, Bernstein I, Tanaka T, Rapp HJ: **Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumor cells and living Mycobacterium bovis (strain BCG).** *Science* 1970, **170**(3963):1217-1218.
146. Vas HFH, Axelrod RS, Burns MM, Murasko D, Goonewardene M: **Clinical results and immunologic effects of a mixed bacterial vaccine in cancer patients.** *Medical oncology and tumor pharmacotherapy* 1993, **10**(4):145-158.
147. Axelrod RS, Havas HF, Murasko DM, Bushnell B, Guan CF: **Effect of the mixed bacterial vaccine on the immune response of patients with non-small cell lung cancer and refractory malignancies.** *Cancer* 1988, **61**(11):2219-2230.
148. Schafer R, Portnoy D, Brassell S, Paterson Y: **Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant Listeria monocytogenes vaccine.** *The Journal of Immunology* 1992, **149**(1):53-59.

149. van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC: **Triggering TLR signaling in vaccination.** *Trends Immunol* 2006, **27**(1):49-55.
150. Carswell E, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B: **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975, **72**(9):3666-3670.
151. Gray P, Forrest G, Wisniewski T, al. e: **Evidence for cyclic diguanylate as a vaccine adjuvant with novel immunostimulatory activities.** *Cellular immunology* 2012, **278**(1-2):113-119.
152. Singh M, Ramos I, Asafu-Adjei D, al. e: **Curcumin improves the therapeutic efficacy of Listeria(at)-Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1.** *Cancer medicine* 2013, **2**(4):571-582.
153. Casares N, Pequignot M, Tesniere A, al. e: **Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(12):1691-1701.
154. Michaud M, Martins I, Sukkurwala A, al. e: **Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice.** *Science* 2011, **334**(6062):1573-1577.
155. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, al. e: **Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.** *Nature medicine* 2007, **13**(1):54-61.

156. Goldszmid RS, Dzutsev A, Trinchieri G: **Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities.** *Cell host & microbe* 2014, **15**(3):295-305.
157. Avogadri F, Martinoli C, Petrovska L, Chiodoni C, Transidico P, Bronte V, Longhi R, Colombo MP, Dougan G, Rescigno M: **Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells.** *Cancer research* 2005, **65**(9):3920-3927.
158. KASAI S, FUJIMOTO S, NITTA K, BABA H, KUNIMOTO T: **Antitumor Activity of Polymorphonuclear Leukocytes Activated by a BETA.-1, 3-D-Glucan.** *Journal of pharmacobio-dynamics* 1991, **14**(9):519-525.
159. Fujii Y, Kimura S, Arai S, Sendo F: **In vivo antitumor effect of lymphokine-activated rodent polymorphonuclear leukocytes.** *Cancer research* 1987, **47**(22):6000-6005.
160. Yang KD, Stone RM, Lee C-S, Chao T-Y, Cheng S-N, Shaio M-F: **Effect of picibanil (OK432) on neutrophil-mediated antitumor activity: implication of monocyte-derived neutrophil-activating factors.** *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1992, **35**(4):277-282.
161. Tan DS, Thomas G, Garrett MD, Banerji U, De Bono JS, Kaye SB, Workman P: **Biomarker-driven early clinical trials in oncology.** *Cancer Journal* 2009, **15**(5):406-420.

162. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E: **Targeting metabolic transformation for cancer therapy**. *Nature Reviews Cancer* 2010, **10(4):267-277**.
163. Brown P, Hunger SP, Smith FO, Carroll WL, Reaman GH: **Novel targeted drug therapies for the treatment of childhood acute leukemia**. *Expert review of hematology* 2009, **2(2):145-158**.
164. Carpiuc K, Stephens J, Botteman M, Feng W, Hay J: **A review of the clinical and economic outcomes of imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia**. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2007, **8(16):2775-2787**.
165. Nahta R, Shabaya S, Ozbay T, Rowe D: **Personalizing HER2-targeted therapy in metastatic breast cancer beyond HER2 status: what we have learned from clinical specimens**. *Current pharmacogenomics and personalized medicine* 2009, **7(4):263-274**.
166. Ismael G, Rosa DD, de Azambuja E, Braga S, Piccart-Gebhart M: **Trastuzumab (herceptin) for early-stage breast cancer**. *Hematology/oncology clinics of North America* 2007, **21(2):239-256**.
167. Schuster SJ, Venugopal P, Kern JC, McLaughlin P: **GM-CSF plus rituximab immunotherapy: translation of biologic mechanisms into therapy for indolent B-cell lymphomas**. *Leukemia & lymphoma* 2008, **49(9):1681-1692**.

168. Rossi A, Bria E, Maione P, Palazzolo G, Falanga M, Gridelli C: **The role of cetuximab and other epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in the treatment of advanced non-small cell lung cancer.** *Reviews on recent clinical trials* 2008, **3**(3):217-227.
169. Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N, Hiddemann W, Jung A, Kirchner T: **The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status.** *Dtsch Arztebl Int* 2009, **106**(12):202-206.
170. Ashihara E, Kawata E, Maekawa T: **Future prospect of RNA interference for cancer therapies.** *Current drug targets* 2010, **11**(3):345-360.
171. Privé GG, Melnick A: **Specific peptides for the therapeutic targeting of oncogenes.** *Current opinion in genetics & development* 2006, **16**(1):71-77.
172. Ho C, Ochsenbein AF, Gautschi O, Davies AM: **Early Clinical Trial Experience with Vaccine Therapies in Non–Small-Cell Lung Cancer.** *Clinical lung cancer* 2008, **9**:S20-S27.
173. Chiarle R, Martinengo C, Mastini C, Ambrogio C, D'Escamard V, Forni G, Inghirami G: **The anaplastic lymphoma kinase is an effective oncoantigen for lymphoma vaccination.** *Nature medicine* 2008, **14**(6):676-680.

174. Romero P: **Current State of Vaccine Therapies in Non–Small-Cell Lung Cancer.** *Clinical lung cancer* 2008, **9**:S28-S36.
175. Matsumura Y, Maeda H: **A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.** *Cancer research* 1986, **46**(12 Part 1):6387-6392.
176. Giaccia A, Siim BG, Johnson RS: **HIF-1 as a target for drug development.** *Nature reviews Drug discovery* 2003, **2**(10):803-811.
177. Verweij J, Pinedo HM: **Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations.** *Anti-cancer drugs* 1990, **1**(1):5-14.
178. Boyd N, Walker P, Thomson R: **The prevention of experimental Clostridium novyi gas gangrene in high-velocity missile wounds by passive immunisation.** *Journal of medical microbiology* 1972, **5**(4):459-465.
179. Boyd N, Thomson R, Walker P: **The prevention of experimental Clostridium novyi and Cl. perfringens gas gangrene in high-velocity missile wounds by active immunisation.** *Journal of medical microbiology* 1972, **5**(4):467-472.
180. Bette P, Oksche A, Mauler F, Eichel-Streiber C, Popoff M, Habermann E: **A comparative biochemical, pharmacological and immunological**

**study of Clostridium novyi  $\alpha$ -toxin, C. difficile toxin B and C. sordellii lethal toxin.** *Toxicon* 1991, **29**(7):877-887.

181. Rood JI, Cole ST: **Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens.** *Microbiological Reviews* 1991, **55**(4):621-648.
182. Bryant AE, Chen RY, Nagata Y, Wang Y, Lee C, Finegold S, Guth PH, Stevens DL: **Clostridial Gas Gangrene. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Microvascular Dysfunction Induced by Exotoxins of Clostridium perfringens.** *Journal of Infectious Diseases* 2000, **182**(3):799-807.
183. Zeuthen LH, Christensen HR, Frøkiær H: **Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria.** *Clinical and Vaccine Immunology* 2006, **13**(3):365-375.
184. Bone RC: **Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome).** *Jama* 1992, **268**(24):3452-3455.
185. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM: **Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome.** *Jama* 1993, **269**(14):1829-1835.

186. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D: **Tumor-targeted Salmonella as novel anticancer vector**. *Cancer Research* 1997, **57**(20):4537-4544.
187. Somerville Jr JE, Cassiano L, Bainbridge B, Cunningham MD, Darveau RP: **A novel Escherichia coli lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide**. *Journal of Clinical Investigation* 1996, **97**(2):359.
188. Clementz T, Zhou Z, Raetz CR: **Function of the Escherichia coli msbB gene, a multicopy suppressor of htrB knockouts, in the acylation of lipid A acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB**. *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(16):10353-10360.
189. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zähringer U, Brade H, Rietschel ET, Dougan G, Charles IG, Maskell DJ: **A lethal role for lipid A in Salmonella infections**. *Molecular microbiology* 1998, **29**(2):571-579.
190. Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J: **Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting in vivo**. *Nature biotechnology* 1999, **17**(1):37-41.
191. Murray SR, Bermudes D, de Felipe KS, Low KB: **Extragenic Suppressors of Growth Defects inmsbB Salmonella**. *Journal of bacteriology* 2001, **183**(19):5554-5561.

192. Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Stock F: **Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma.** *Journal of Clinical Oncology* 2002, **20(1):142-152.**
193. Heimann DM, Rosenberg SA: **Continuous intravenous administration of live genetically modified Salmonella typhimurium in patients with metastatic melanoma.** *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md: 1997)* 2003, **26(2):179.**
194. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C, Cavagnolo R, Cahill A, Clairmont C, Sznol M: **Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients.** *Cancer gene therapy* 2003, **10(10):737-744.**
195. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ: **A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, **86(13):5054-5058.**
196. Galán JE, Curtiss R: **Virulence and vaccine potential of phoP mutants of Salmonella typhimurium.** *Microbial pathogenesis* 1989, **6(6):433-443.**

197. Miller SI: **PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of Salmonella virulence?** *Molecular microbiology* 1991, **5**(9):2073-2078.
198. Groisman EA, Chiao E, Lipps CJ, Heffron F: **Salmonella typhimurium phoP virulence gene is a transcriptional regulator.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989, **86**(18):7077-7081.
199. Miller SI, Mekalanos J: **Constitutive expression of the phoP regulon attenuates Salmonella virulence and survival within macrophages.** *Journal of bacteriology* 1990, **172**(5):2485-2490.
200. Bettegowda C, Dang LH, Abrams R, Huso DL, Dillehay L, Cheong I, Agrawal N, Borzillary S, McCaffery JM, Watson EL: **Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(25):15083-15088.
201. Mei S, Theys J, Landuyt W, Anne J, Lambin P: **Optimization of tumor-targeted gene delivery by engineered attenuated Salmonella typhimurium.** *Anticancer research* 2002, **22**(6A):3261-3266.
202. Chen G, Wei DP, Jia LJ, Tang B, Shu L, Zhang K, Xu Y, Gao J, Huang XF, Jiang WH *et al*: **Oral delivery of tumor-targeting Salmonella exhibits promising therapeutic efficacy and low toxicity.** *Cancer Sci* 2009, **100**(12):2437-2443.

203. Roberts NJ, Zhang L, Janku F, Collins A, Bai R-Y, Staedtke V, Rusk AW, Tung D, Miller M, Roix J: **Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses.** *Science translational medicine* 2014, **6**(249):249ra111-249ra111.
204. Diaz LA, Cheong I, Foss CA, Zhang X, Peters BA, Agrawal N, Bettegowda C, Karim B, Liu G, Khan K: **Pharmacologic and toxicologic evaluation of C. novyi-NT spores.** *Toxicological Sciences* 2005, **88**(2):562-575.
205. Möse J, Möse G: **Onkolyseversuche mit apathogenen, anaeroben Sporenbildnern am Ehrlich-Tumor der Maus.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1959, **63**(1):63-74.
206. Möse J: **[Experiments to improve the oncolysis-effect of clostridial-strain M55 (author's transl)].** *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* 1979, **244**(4):541–545.
207. Heppner F, Tritthart H, Holzer P: **Surgical therapy of traumatic intracerebral hematomas.** *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 1978, **128**(44):635.
208. Morse SS: **Evolving views of viral evolution: towards an evolutionary biology of viruses.** *History and philosophy of the life sciences* 1992:215-248.

209. Luo X, Li Z, Lin S, Le T, Ittensohn M, Bermudes D, Runyab JD, Shen S, Chen J, King IC: **Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models.** *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 2001, **12**(11-1):501-508.
210. Lee CH, Wu CL, Shiau AL: **Endostatin gene therapy delivered by Salmonella choleraesuis in murine tumor models.** *J Gene Med* 2004, **6**(12):1382-1393.
211. Wang L, Pan L, Shi L, Sun Y, Zhang Y, Zhou D: **Roles of bifidobacterium on prevention of experimental colorectal carcinoma and induction of apoptosis.** *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* 1999, **33**(6):337.
212. Nersessian AK, Zilfian VN, Koumkoumadjian VA: **Inhibitory effect of rat immunization with tularemia vaccine on the in vivo clastogenicity of 4 anthracycline antibiotics.** *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1991, **260**(2):215-218.
213. Heppner F, Möse JR, Ascher PW: **Oncolysis of malignant glioma of the brain.** In *Proc VIIIth Int Congr Chemother.* 1983: 38-44.
214. Dietzel F, Gericke D, König W: **[Tumor hyperthermia using high frequency for increase of oncolysis by clostridium butyricum (M 55)].** *Strahlentherapie* 1976, **152**(6):537-541.

215. Dietzel F, Gericke D: **[Intensification of the oncolysis by clostridia by means of radio-frequency hyperthermy in experiments on animals--dependence on dosage and on intervals (author's transl)].** *Strahlentherapie* 1977, **153**(4):263-266.
216. Gericke D, Dietzel F, Ruster I: **Further progress with oncolysis due to local high frequency hyperthermia, local x-irradiation and a pathogenic clostridia.** *The Journal of microwave power* 1979, **14**(2):163.
217. Heppner F: **The glioblastoma multiforme: a lifelong challenge to the neurosurgeon.** *Neurochirurgia* 1986, **29**(1):9-14.
218. Peters L, Byers R, Ang K: **Radiotherapy for melanoma.** In *Cutaneous melanoma (2nd edn)*. Edited by Balch C, Houghton A, Milton G, al e. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1992: 509–521.
219. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J *et al*: **Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy.** *J Exp Med* 2006, **203**(5):1259-1271.
220. Platt J, Sodi S, Kelley M, Rockwell S, Bermudes D, Low K, Pawelek J: **Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation.** *European Journal of Cancer* 2000, **36**(18):2397-2402.

221. Schlechte H, Schwabe K, Mehnert W, Schulze B, Bräuniger H: **Chemotherapy for tumours using clostridial oncolysis, antibiotics and cyclophosphamide: model trial on the UVT 15264 tumour.** *Archiv für Geschwulstforschung* 1981, **52**(1):41-48.
222. Darji A, Guzmán CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S: **Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*.** *Cell* 1997, **91**(6):765-775.
223. Baban CK, Cronin M, O'Hanlon D, O'Sullivan GC, Tangney M: **Bacteria as vectors for gene therapy of cancer.** *Bioeng Bugs* 2010, **1**(6):385-394.
224. Schlechte H, Elbe B: **Recombinant plasmid DNA variation of clostridium oncolyticum — model experiments of cancerostatic gene transfer.** *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 1988, **268**(3):347-356.
225. Theys J, Pennington O, Dubois L, Anlezark G, Vaughan T, Mengesha A, Landuyt W, Anné J, Burke P, Dürre P: **Repeated cycles of Clostridium-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo.** *British journal of cancer* 2006, **95**(9):1212-1219.
226. Liu S, Minton N, Giaccia A, Brown J: **Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis.** *Gene therapy* 2002, **9**(4):291-296.

227. Wei MQ, Ellem KA, Dunn P, West MJ, Bai CX, Vogelstein B: **Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours.** *Eur J Cancer* 2007, **43**(3):490-496.
228. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang C-P, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA *et al*: **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** *Immunity* 1995, **3**(6):673-682.
229. Ganai S, Arenas RB, Forbes NS: **Tumour-targeted delivery of TRAIL using Salmonella typhimurium enhances breast cancer survival in mice.** *Br J Cancer* 2009, **101**(10):1683-1691.
230. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL: **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** *cell* 2000, **102**(1):43-53.
231. Fu W, Chu L, Han X, Liu X, Ren D: **Synergistic antitumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium in murine tumor models.** *J Gene Med* 2008, **10**(6):690-701.

232. Orlinick JR, Vaishnaw AK, Elkon KB: **Structure and function of Fas/Fas ligand**. *International reviews of immunology* 1999, **18**(4):293-308.
233. Peter M, Hadji A, Murmann A, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P: **The role of CD95 and CD95 ligand in cancer**. *Cell Death & Differentiation* 2015, **22**(4):549-559.
234. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC: **Inhibition of tumor growth using salmonella expressing Fas ligand**. *Journal of the National Cancer Institute* 2008, **100**(15):1113-1116.
235. Barbé S, Van Mellaert L, Theys J, Geukens N, Lammertyn E, Lambin P, Anné J: **Secretory production of biologically active rat interleukin-2 by Clostridium acetobutylicum DSM792 as a tool for anti-tumor treatment**. *FEMS microbiology letters* 2005, **246**(1):67-73.
236. Siegel JP, Puri R: **Interleukin-2 toxicity**. *Journal of Clinical Oncology* 1991, **9**(4):694-704.
237. Saltzman DA, Heise CP, Hasz DE, Zebede M, Kelly SM, Curtiss III R, Leonard AS, Anderson PM: **Attenuated Salmonella typhimurium containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: a novel anti-tumor agent**. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 1996, **11**(2):145-153.

238. Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA: **Attenuated Salmonella typhimurium with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma.** *Clinical orthopaedics and related research* 2008, **466**(6):1285-1291.
239. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP: **Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”.** *Journal of leukocyte biology* 2012, **92**(4):753-764.
240. Biet F, Loch C, Kremer L: **Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens.** *Journal of molecular medicine* 2002, **80**(3):147-162.
241. Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Mastroeni P, Fernandez M, Martinez MA, Chabalgoity JA: **Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma.** *The journal of gene medicine* 2007, **9**(5):416-423.
242. Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC: **IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth.** *Cancer Gene Ther* 2008, **15**(12):787-794.
243. Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC: **Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(31):12879-12883.

244. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC: **Salmonella typhimurium engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth.** *Cancer immunology, immunotherapy* 2009, **58**(5):769-775.
245. Theys J, Nuyts S, Landuyt W, Van Mellaert L, Dillen C, Böhringer M, Dürre P, Lambin P, Anné J: **Stable Escherichia coli-Clostridium acetobutylicum shuttle vector for secretion of murine tumor necrosis factor alpha.** *Applied and environmental microbiology* 1999, **65**(10):4295-4300.
246. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: **The three Es of cancer immunoediting.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:329-360.
247. Nishikawa H, Sato E, Briones G, Chen LM, Matsuo M, Nagata Y, Ritter G, Jager E, Nomura H, Kondo S *et al*: **In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines.** *J Clin Invest* 2006, **116**(7):1946-1954.
248. Panthel K, Meinel KM, Sevil Domenech VE, Geginat G, Linkemann K, Busch DH, Russmann H: **Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system.** *Microbes Infect* 2006, **8**(9-10):2539-2546.
249. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA: **A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth.** *Nat Med* 2002, **8**(12):1369-1375.

250. Malinda KM: **In vivo matrigel migration and angiogenesis assay**. In *Angiogenesis Protocols: Second Edition*. Edited by Martin S, Murray C: Humana Press (Springer); 2009: 287-294.
251. Qiu S, Adema CM, Lane T: **A computational study of off-target effects of RNA interference**. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(6):1834-1847.
252. Hutvagner G, Simard MJ: **Argonaute proteins: key players in RNA silencing**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(1):22-32.
253. Zhang L, Gao L, Zhao L, Guo B, Ji K, Tian Y, Wang J, Yu H, Hu J, Kalvakolanu DV: **Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs**. *Cancer research* 2007, **67**(12):5859-5864.
254. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ: **Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics**. *Clinical Cancer Research* 2008, **14**(16):5000-5005.
255. Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, Lufei C, Zeng Q, Cao X: **GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I**. *Mol Cell Biol* 2004, **24**(19):8447-8456.
256. Liu Y-B, Zhang L, Guo Y-X, Gao L-F, Liu X-C, Zhao L-J, Guo B-F, Zhao L-J, Zhao X-J, Xu D-Q: **Plasmid-based Survivin shRNA and**

- GRIM-19 carried by attenuated Salmonella suppresses tumor cell growth.** *Asian journal of andrology* 2012, **14**(4):536.
257. Wen L-J, Gao L-F, Jin C-S, Zhang H-J, Ji K, Yang J-P, Zhao X-J, Wen M-J, Guan G-F: **Small interfering RNA survivin and GRIM-19 co-expression salmonella plasmid inhibited the growth of laryngeal cancer cells in vitro and in vivo.** *Int J Clin Exp Pathol* 2013, **6**(10):2071-2081.
258. Li X, Li Y, Hu J, Wang B, Zhao L, Ji K, Guo B, Yin D, Du Y, Kopecko DJ: **Plasmid-based E6-specific siRNA and co-expression of wild-type p53 suppresses the growth of cervical cancer in vitro and in vivo.** *Cancer letters* 2013, **335**(1):242-250.
259. Brown JM, Wilson WR: **Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment.** *Nature Reviews Cancer* 2004, **4**(6):437-447.
260. Cobb L, Connors T, Elson L, Khan A, Mitchley B, Ross W, Whisson M: **2, 4-Dinitro-5-ethyleneiminobenzamide (CB 1954): a potent and selective inhibitor of the growth of the Walker carcinoma 256.** *Biochemical pharmacology* 1969, **18**(6):1519-1527.
261. Knox RJ, Friedlos F, Biggs PJ, Flitter WD, Gaskell M, Goddard P, Davies L, Jarman M: **Identification, synthesis and properties of 5-(aziridin-1-yl)-2-nitro-4-nitrosobenzamide, a novel DNA crosslinking agent derived from CB1954.** *Biochemical pharmacology* 1993, **46**(5):797-803.

262. Knox RJ, Friedlos F, Sherwood RF, Melton RG, Anlezark GM: **The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2, 4-dinitrobenzamide (CB1954)—II: A comparison of an Escherichia coli nitroreductase and Walker DT diaphorase.** *Biochemical pharmacology* 1992, **44**(12):2297-2301.
263. Anlezark GM, Vaughan T, Fashola-Stone E, Michael NP, Murdoch H, Sims MA, Stubbs S, Wigley S, Minton NP: **Bacillus amyloliquefaciens orthologue of Bacillus subtilis ywrO encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954.** *Microbiology* 2002, **148**(1):297-306.
264. Minton NP, Mauchline ML, Lemmon MJ, Brehm JK, Fox M, Michael NP, Giaccia A, Brown JM: **Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores.** *FEMS microbiology reviews* 1995, **17**(3):357-364.
265. Fox M, Lemmon M, Mauchline M, Davis T, Giaccia A, Minton N, Brown J: **Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia.** *Gene therapy* 1996, **3**(2):173-178.
266. Theys J, Landuyt A, Nuyts S, Van Mellaert L, Lambin P, Anné J: **Clostridium as a tumor-specific delivery system of therapeutic proteins.** *Cancer detection and prevention* 2000, **25**(6):548-557.
267. Theys J, Landuyt W, Nuyts S, Van Mellaert L, Bosmans E, Rijnders A, Van Den Bogaert W, Van Oosterom A, Anné J, Lambin P: **Improvement of Clostridium tumour targeting vectors evaluated in rat**

- rhabdomyosarcomas.** *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2001, **30**(1):37-41.
268. Lambin SN, W. Landuyt, J. Theys, E. De Bruijn, J. Anne, L. Van Mellaert, J. Fowler, P: **The potential therapeutic gain of radiation-associated gene therapy with the suicide gene cytosine deaminase.** *International journal of radiation biology* 2000, **76**(3):285-293.
269. Lemmon M, Van Zijl P, Fox M, Mauchline M, Giaccia A, Minton N, Brown J: **Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment.** *Gene therapy* 1997, **4**(8).
270. Sasaki T, Fujimori M, Hamaji Y, Hama Y, Ito Ki, Amano J, Taniguchi Si: **Genetically engineered Bifidobacterium longum for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats.** *Cancer science* 2006, **97**(7):649-657.
271. Bermudes D, Low B, Pawelek JM: **Tumor-Targeted Salmonella: Strain Development and Expression of the HSV-tK Effector Gene.** In *Gene Therapy: Methods and Protocols*. Edited by Walther W, Stein U. Totowa: Humana Press; 2000: 419-436.
272. Garapin AC, Colbère-Garapin F, Cohen-Solal M, Horodniceanu F, Kourilsky P: **Expression of herpes simplex virus type I thymidine kinase gene in Escherichia coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1981, **78**(2):815-819.

273. Chung-Faye G, Palmer D, Anderson D, Clark J, Downes M, Baddeley J, Hussain S, Murray PI, Searle P, Seymour L: **Virus-directed, Enzyme Prodrug Therapy with Nitroimidazole Reductase A Phase I and Pharmacokinetic Study of its Prodrug, CB1954.** *Clinical cancer research* 2001, **7**(9):2662-2668.
274. Liu S-C, Ahn G-O, Kioi M, Dorie M-J, Patterson AV, Brown JM: **Optimized clostridium-directed enzyme prodrug therapy improves the antitumor activity of the novel DNA cross-linking agent PR-104.** *Cancer research* 2008, **68**(19):7995-8003.
275. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, Pullen SM, Hicks KO, Syddall SP, Atwell GJ: **Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104.** *Clinical Cancer Research* 2007, **13**(13):3922-3932.
276. **PR104 in Treating Patients With Refractory/Relapsed Acute Leukemia** [<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01037556>]
277. McKeage MJ, Jameson MB, Ramanathan RK, Rajendran J, Gu Y, Wilson WR, Melink TJ, Tchekmedyian NS: **PR-104 a bio-reductive pre-prodrug combined with gemcitabine or docetaxel in a phase Ib study of patients with advanced solid tumours.** *BMC cancer* 2012, **12**(1):1.
278. Singleton D, Li D, Bai S, Syddall S, Smaill J, Shen Y, Denny W, Wilson W, Patterson A: **The nitroreductase prodrug SN 28343 enhances the**

- potency of systemically administered armed oncolytic adenovirus ONYX-411NTR.** *Cancer gene therapy* 2007, **14**(12):953-967.
279. Grove JI, Lovering AL, Guise C, Race PR, Wrighton CJ, White SA, Hyde EI, Searle PF: **Generation of Escherichia coli nitroreductase mutants conferring improved cell sensitization to the prodrug CB1954.** *Cancer research* 2003, **63**(17):5532-5537.
280. Race PR, Lovering AL, White SA, Grove JI, Searle PF, Wrighton CW, Hyde E: **Kinetic and structural characterisation of Escherichia coli nitroreductase mutants showing improved efficacy for the prodrug substrate CB1954.** *Journal of molecular biology* 2007, **368**(2):481-492.
281. Hamaji Y, Fujimori M, Sasaki T, Matsubashi H, Matsui-Seki K, Shimatani-Shibata Y, Kano Y, Amano J, TANIGUCHI Si: **Strong enhancement of recombinant cytosine deaminase activity in Bifidobacterium longum for tumor-targeting enzyme/prodrug therapy.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2007, **71**(4):874-883.
282. Emptage CD, Knox RJ, Danson MJ, Hough DW: **Nitroreductase from Bacillus licheniformis: a stable enzyme for prodrug activation.** *Biochemical pharmacology* 2009, **77**(1):21-29.
283. Heap JT: **Novel prodrug-converting enzymes and a directed DNA integration method for clostridia.** University of Nottingham; 2007.

284. Heap JT, Ehsaan M, Cooksley CM, Ng Y-K, Cartman ST, Winzer K, Minton NP: **Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker.** *Nucleic acids research* 2012, **40(8):e59-e59.**
285. Heap JT, Theys J, Ehsaan M, Kubiak AM, Dubois L, Paesmans K, Van Mellaert L, Knox R, Kuehne SA, Lambin P: **Spores of Clostridium engineered for clinical efficacy and safety cause regression and cure of tumors in vivo.** *Oncotarget* 2014, **5:1761-1769.**
286. Administration UFaD: **Guidance for Industry, Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products.** 2015.
287. Administration UFaD: **Guidance for Industry, Determining the Need for and Content of Environmental Assessments for Gene Therapies, Vectored Vaccines, and Related Recombinant Viral or Microbial.** 2015.
288. *Seminars in oncology: 2001*: Elsevier; 2001: 3-8.
289. Lee C-H, Wu C-L, Chen S-H, Shiau A-L: **Humoral immune responses inhibit the antitumor activities mediated by Salmonella enterica serovar Choleraesuis.** *Journal of Immunotherapy* 2009, **32(4):376-388.**

290. Lee C-H, Hsieh J-L, Wu C-L, Hsu H-C, Shiau A-L: **B cells are required for tumor-targeting Salmonella in host.** *Applied microbiology and biotechnology* 2011, **92**(6):1251-1260.
291. Ferat J-L, Michel F: **Group II self-splicing introns in bacteria.** 1993.
292. TOOR N, HAUSNER G, ZIMMERLY S: **Coevolution of group II intron RNA structures with their intron-encoded reverse transcriptases.** *Rna* 2001, **7**(08):1142-1152.
293. Cui X, Matsuura M, Wang Q, Ma H, Lambowitz AM: **A group II intron-encoded maturase functions preferentially in cis and requires both the reverse transcriptase and X domains to promote RNA splicing.** *Journal of molecular biology* 2004, **340**(2):211-231.
294. Curcio MJ, Belfort M: **Retrohoming: cDNA-mediated mobility of group II introns requires a catalytic RNA.** *Cell* 1996, **84**(1):9-12.
295. Cousineau B, Lawrence S, Smith D, Belfort M: **Retrotransposition of a bacterial group II intron.** *Nature* 2000, **404**(6781):1018-1021.
296. Frazier CL, San Filippo J, Lambowitz AM, Mills DA: **Genetic manipulation of Lactococcus lactis by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection.** *Applied and environmental microbiology* 2003, **69**(2):1121-1128.

297. Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, Rood JI, Gupta P: **Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of Clostridium perfringens type A by use of a mobile group II intron.** *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(11):7542-7547.
298. Michel F, Jacquier A, Dujon B: **Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure.** *Biochimie* 1982, **64**(10):867-881.
299. Peebles CL, Perlman P, Mecklenburg K, Petrillo M, Tabor J, Jarrell K, Cheng H-L: **A self-splicing RNA excises an intron lariat.** *Cell* 1986, **44**(2):213-223.
300. Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP: **The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus Clostridium.** *Journal of microbiological methods* 2007, **70**(3):452-464.

# *Serment d'Hippocrate*

*Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.*

- Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité, la santé de mes malades sera mon premier but.*
- Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- Je maintiendrai, par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- Les médecins seront mes frères.*
- Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'imposera entre mon devoir et mon patient.*
- Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

*Déclaration de Genève,*

*1948*

# قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية؛
  - وأن أحترم أساتذتي وأعتزف لهم بالجميل الذي يستحقونه؛
  - وأن أمارس مهنتي بوازح من ضميري وشرفي جالسا صحة مريضى هدفى الأول؛
  - وألا أفشى الأسرار المعصودة إلي؛
  - وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب؛
  - وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي؛
  - وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي؛
  - وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها؛
  - وألا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد؛
  - بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسم بشرفي.
- والله على ما أقول شهيد.

## العلاج الباكثيري الحال للورم

### أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : .....

من طرفه

**السيد : محمد طه التغموتي**

المزودة في : 05 أبريل 1990 بأكادير

### لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: العلاج بالباكتيريا الحالة للورم - الجمع بين العلاج - العلاج الجيني -  
أليات - سالمونيلا - كلوستريديوم.

### تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد : ميمون زوهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيدة : سكيمة الحمزاوي

أستاذة في علم الأحياء الدقيقة

السيد : محمد إيشو

أستاذ في علم الأورام الطبية

السيد : عبد القادر لعتريس

أستاذ في علم الصيدلة

السيدة : سعيدة طلال

أستاذة في علم الكيمياء الحيوية

السيد : ياسين سخسوخ

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيد : أحمد كاوزي

أستاذ في طب الأطفال