



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4210](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4210)

To cite this version :

MORAND, Sylvia. *Virothérapie anticancéreuse chez les carnivores domestiques : actualités bibliographiques*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 104 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

Virothérapie anticancéreuse chez les carnivores domestiques : actualités bibliographiques

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT
*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par*

MORAND Sylvia
Née, le 14 mai 1985 à LAXOU (54)

Directeur de thèse : Mr. le Professeur Maxence DELVERDIER

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Maxence DELVERDIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. ECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*
Mlle **DEBREUQUE Maud**, *Médecine Interne*
M **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*
M. **LE BOEDÉC Kevin**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

Je remercie,

Le Professeur Maxence Delverdier, directeur de cette thèse, pour m'avoir proposé ce sujet et avoir dirigé ces travaux. Ainsi que pour m'avoir permis d'intégrer l'USP pour mes dernières années de joueuse de basket.

Le Professeur Stephane Bertagnoli, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir encadrée, et conseillée avec une grande disponibilité. Un grand merci pour les corrections de ce manuscrit.

Le Professeur Christophe Pasquier pour avoir accepté d'être Président du jury.

Merci du fond du cœur à mes parents pour leur soutien et leur amour inconditionnel, je vous aime.

A mon « petit » frère adoré qui ne pouvant se passer de sa grande sœur m'a rejoint à Toulouse pour profiter loin des parents, à toutes nos escapades passées et à venir ^^

A mes grands parents en espérant qu'ils sont fiers de leur petite-fille !

A toute ma famille : oncles, tantes et cousin(e)s, qui a toujours été présente lorsque j'en ai eu besoin, en particulier aux Parisiens qui m'ont supporté pendant les années de prépa !

Un grand merci également à tous les amis vétos ou non : Blandine, Brigitte, Caroline, Cécile, Claire, Emilie, Guillaume et Pierrou qui m'ont soutenue et qui ont traversé des années de galère avec moi pour nous la thèse n'est pas la fin mais le commencement de notre nouvelle vie : qu'elle nous permette de rester toujours proches quelque soit la distance qui nous sépare!

Enfin merci aux abeilles de Plaisance pour tout ces bons moments qui ont rythmé mes dernières années de joueuse...

Table des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
AAV	: adenovirus associated virus
Ac	: anticorps
AdV	: adenovirus
Ag	: antigène
CAR	: coxsackie adenovirus receptor
CAV	: canine adenovirus
CDV	: canine distemper virus/ virus de la maladie de Carré
CMV	: cytomegalovirus
CPA	: cellules présentatrices d'Ag
CPE	: effets cytopathiques
CRAd	: conditionnaly replicative adenovirus/ adénovirus conditionnellement répliatif
DOX	: doxycycline
EEV	: extracellular enveloped virus/virus extracellulaire enveloppe
EGF	: epithelial growth factor/facteur de croissance épithéliale
EGFR	: EGF receptor/récepteur a l'EGF
GCV	: ganciclovir
GCVTP	: ganciclovir tri-phosphate
GFP	: green fluorescent protein
HC – Ads	: high capacity adenovirus
HSV	: herpes simplex virus/virus herpes simplex
IP	: intra-prostatique
IT	: intra-tumoral
IV	: intra-vasculaire
kpb	: kilo paire de base
LT(c/h)	: lymphocyte T (cytotoxique ou helper)
MDV	: virus de la rougeole
MEC	: matrice extracellulaire
MMP	: métalloprotéases de matrice

NDV : newcastle disease virus

NIS : Na⁺/I⁻ Symporteur

NK : natural killer

NL : nœud lymphatique

OC : ostéocalcine

PCR : polymerase chain reaction/reaction polymérase en chaîne

PKR : protéine kinase ARNdb-dépendante

pRB : retinoblastoma protein/protéine du rétinoblastome

RECK : reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

RI : réponse immunitaire

RT : reverse transcriptase/transcription inverse)

SC : sous cutané

SI : système immunitaire

TAA : tumor associated antigen/antigène associés aux tumeurs

TIMP : tissus inhibiteurs de métalloprotéases

TK : thymidine kinase

VEGF : vascular growth endothelial factor/facteur de croissance endothéliale vasculaire

VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	12
INTRODUCTION.....	15
PREMIERE PARTIE : « GENERALITES ».....	17
I. Particularités de la cellule cancéreuse	18
A. Autosuffisance pour les signaux de croissance.....	19
B. Perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance.....	19
C. Echappement à l'apoptose	19
D. Potentiel de réplication illimité.....	20
E. Angiogenèse tumorale	20
F. Capacité d'invasion des tissus et de métastases.....	20
II. Les virus potentiellement utilisables dans la lutte contre le cancer	21
A. Virus naturellement oncolytiques	21
1. <i>Parvoviridae</i>	21
2. <i>Reoviridae</i>	23
3. <i>Rhabdoviridae</i>	24
4. <i>Paramyxoviridae</i>	25
5. <i>Circoviridae</i>	27
B. Virus génétiquement modifiés	28
1. <i>Adenoviridae</i>	28
2. <i>Retroviridae</i>	32
3. <i>Herpesviridae</i>	33
4. <i>Poxviridae</i>	35
III. Différents modes d'action	37
A. Oncolyse virale directe	37
1. Destruction directe par la réplication virale.....	37
2. Protéines virales oncotoxiques.....	37
B. Induction d'une immunité anti-tumorale	38
1. Oncolysats.....	38
2. Synthèse et présentation d'Ag viraux sur les cellules tumorales.....	38

C.	Vecteurs de transgènes thérapeutiques	40
1.	Principe	40
2.	Ciblage des vecteurs au niveau de l'infection.....	40
3.	Principe de la thérapie gène suicide.....	42
DEUXIEME PARTIE : « RESULTATS ACTUELS ».....		43
I.	Oncolyse virale directe	44
A.	Action oncolytique des protéines virales : l'Apoptine ou VP3 (Lee JJ et al, 2007)...	44
1.	Principe	44
2.	Résultats.....	45
3.	Discussion.....	47
B.	Oncolyse virale directe	48
1.	Effets du virus de la vaccine sur des tumeurs mammaires canines (Gentschev I et al, 2009).....	48
2.	Effet d'une infection par le virus de la maladie de Carré (CDV) sur les lymphomes	51
C.	Oncolyse virale par virus recombiné ciblant la tumeur : Ostéosarcomes (Smith BF et al 2006)	57
1.	Conception du virus	57
2.	Test d'efficacité	58
3.	Innocuité	59
II.	Stimulation et orientation de la réponse immunitaire de l'hôte	60
A.	Mélanome : 2 cas cliniques (Von Euler et al, 2008).....	60
1.	Principe du virus utilisé	60
2.	Cas clinique n°1	61
3.	Cas clinique n°2	63
4.	Conclusion	66
III.	Thérapie par gène-suicide sur les tumeurs cérébrales : GCV/TK.....	67
A.	Cibler la tumeur : étude de l'expression d'un transgène sur un méningiome canin in vivo (Chauvet AE et al, 1998)	67
1.	Présentation du sujet	67
2.	Protocole	68
3.	Résultats.....	68
4.	Toxicité	69
B.	TK/ GCV sur les gliomes (Candolfi M et al, 2007).....	70
1.	Principe	70
2.	Tests d'expression et de bio efficacité.....	71

IV.	Potentialisation des thérapies conventionnelles : potentialisation de la radiothérapie sur le cancer de la prostate	77
A.	Vecteur et transgène.....	77
1.	Le virus utilisé.....	77
2.	Principe du gène thérapeutique (Perricaudet M et al, 2007).....	77
B.	Choisir une voie d'administration (Carraher J et al, 1999).....	79
1.	Protocole (Carraher J et al 1999)	79
2.	Expression du transgène dans la prostate.....	80
3.	Dissémination dans l'organisme	80
C.	Efficacité IP (Weld KJ et al, 2002).....	81
1.	Protocole (Weld KJ et al, 2002).....	81
2.	Résultats.....	82
3.	Dissémination	82
D.	Utilisation thérapeutique : radiographie et radiothérapie métabolique (Dwyer R et al 2005)	83
1.	Protocole (Dwyer R et al, 2005)	83
2.	Résultats.....	84
3.	Innocuité	84
E.	Conclusion	85
	TROISIEME PARTIE : LIMITES ET PERSPECTIVES.....	87
A.	Prévoir l'efficacité d'un virus oncolytique	88
B.	Interaction avec le système immunitaire de l'hôte	89
C.	Biosécurité	91
D.	Limites pratiques/ Matériel	91
II.	Les carnivores domestiques : un modèle animal pour l'homme	92
A.	Les limites des modèles murins immunodéficients	92
B.	Le chien un modèle plus ressemblant	92
	CONCLUSION.....	95

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Propriétés responsables du caractère malin des cellules cancéreuses.....	14
Figure 2. Cycle lytique des parvovirus.....	18
Figure 3. Cycle réplicatif du réovirus.....	19
Figure 4. Représentation schématique du cycle d'un rhabdovirus.....	20
Figure 5. Cycle de réplication d'un Morbillivirus.....	22
Figure 6. Représentation schématique d'un adénovirus et de son génome.....	24
Figure 7. Cycle de réplication d'un adénovirus.....	25
Figure 8. Mécanisme de fonctionnement simplifié d'un CRAAd.....	26-27
Figure 9. Cycle de réplication d'un rétrovirus.....	28
Figure 10. Cycle de réplication d'un herpèsvirus.....	30
Figure 11. Représentation schématique d'un poxvirus et de son génome.....	31
Figure 12. Représentation schématique du cycle de réplication des poxviridés.....	32
Figure 13. Représentation schématique de l'action oncolytique d'un virus.....	33
Figure 14. L'apprêtement des antigènes viraux par les molécules HLA-I.....	35
Figure 15. Ciblage d'un adénovirus.....	37
Figure 16. Principe d'utilisation des vecteurs viraux ciblés pour la thérapie génique.....	37
Figure 17. Représentation schématique de l'action d'un gène suicide.....	38
Figure 18. Fluorescence d'EGFP-VP3 sur les cultures CMT (E-F) et cellules saines (G-H)...	41
Figure 19. Evolution de la taille des tumeurs au cours des jours.....	45
Figure 20. Représentation schématique d'OC-CAVE1.....	52
Figure 21. Mélanome récidivant après diathermie avant la thérapie génique.....	56
Figure 22. Injection intra-tumorale sous sédation.....	57
Figure 23. Mélanome 14 jours après début de la thérapie génique et avant réduction chirurgicale.....	57
Figure 24. Réduction chirurgicale et plastie de la lèvre inférieure.....	58
Figure 25. Mélanome récidivant après exérèse chirurgicale et avant thérapie génique.....	59
Figure 26. Aspect après deux injections.....	60
Figure 27. Aspect après six injections.....	60
Figure 28. IRM de la tête du chien révélant une masse frontale compatible avec un méningiome.....	62

Figure 29. A. Aspect macro et microscopique du tissu tumoral B. Aspect macro et microscopique du tissu péritumoral.....	63
Figure 30. Expression in vitro de β -gal (A), HSV1-TK (B), et Flt3L sur des cultures cellulaires de gliomes canins.....	67
Figure 31. Acitivit� β -gal dans la prostate en fonction de la voie d'administration.....	75

Introduction

Le cancer est une pathologie dont l'occurrence est en constante progression tant dans le milieu humain qu'animal notamment du fait de l'augmentation de l'espérance de vie. Le terme de cancer regroupe un ensemble de maladies caractérisées par une prolifération illimitée de cellules capables d'échapper à une mort cellulaire programmée (appelée apoptose), et de métastaser dans l'organisme. Sur le plan thérapeutique, les traitements conventionnels cytostatiques et cytotoxiques n'ont qu'une sélectivité imparfaite vis-à-vis des cellules tumorales. Ils entraînent des effets secondaires, parfois sévères, qui limitent les doses auxquelles ils peuvent être administrés. La cancérologie clinique réclame donc le développement de nouvelles méthodes thérapeutiques plus efficaces mais aussi mieux tolérées. Pour répondre à ces besoins, la recherche sur le cancer se tourne vers le développement de « stratégies ciblées » visant à agir spécifiquement sur la cellule cancéreuse. De nouvelles voies s'orientent entre autres vers le développement de systèmes multifonctionnels combinant propriétés de ciblage tumoral et propriétés diagnostiques et/ou thérapeutiques effectives. Parmi celles-ci, l'utilisation de virus oncolytiques.

L'idée d'utiliser des virus pour lutter contre le cancer n'est pas nouvelle. Dans les années 1920 les scientifiques avaient noté une corrélation entre la présence de virus et la régression de certaines tumeurs. Des recherches, alors peu productives, avaient conduit à l'abandon d'investigations plus poussées. Cependant les avancées réalisées depuis dans le domaine de la biologie moléculaire remettent plus que jamais cette idée à l'ordre du jour.

Certains virus sont naturellement oncotropiques, ce qui leur permet de se répliquer uniquement dans les cellules cancéreuses grâce à l'altération de récepteurs de surfaces ou de la machinerie génétique de ces cellules. Cependant la plupart des virus étudiés pour le traitement du cancer ont été génétiquement modifiés afin de restreindre leur réplication aux cellules cancéreuses. Les virus capables d'induire sélectivement la lyse de cellules néoplasiques sont qualifiés d'oncolytiques et incluent certains paramyxovirus (virus de la maladie de Newcastle et virus de la rougeole), adénovirus et virus herpès simplex modifiés, réovirus, virus de la stomatite vésiculaire, certains poxvirus et parvovirus autonomes de rongeurs. La compréhension des propriétés oncolytiques de ces virus au niveau moléculaire est un atout majeur pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer.

Nous étudierons dans un premier temps les caractéristiques des différents types de virus utilisés dans la lutte contre le cancer. Nous verrons ensuite de quelle façon ils sont actuellement employés dans le milieu vétérinaire. Enfin nous verrons quelles sont les limites de ces agents thérapeutiques et les perspectives qu'ils offrent dans la lutte contre le cancer.

Première partie : « Généralités »

I. Particularités de la cellule cancéreuse

Une tumeur a plusieurs attributs phénotypiques qui lui sont caractéristiques : une croissance excessive, une infiltration locale, la capacité de former des métastases à distance, etc. Ces caractéristiques sont acquises au fur et à mesure, un processus appelé la progression tumorale. Au niveau moléculaire, cette progression résulte de l'accumulation de lésions génétiques qui sont favorisées par une anomalie de la réparation de l'ADN. Les modifications génétiques qui accompagnent la progression tumorale impliquent de nombreux gènes de régulation, de croissance, etc.

La cellule cancéreuse acquiert donc certaines propriétés lui conférant sa malignité dont six caractéristiques fondamentales qui dictent le phénotype malin (Hanahan et Weinberg, 2000):

- une autosuffisance pour les signaux de croissance
- une perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance
- un échappement à l'apoptose
- un potentiel de réplication illimité
- une angiogénèse tumorale
- une capacité à envahir des tissus et à former des métastases

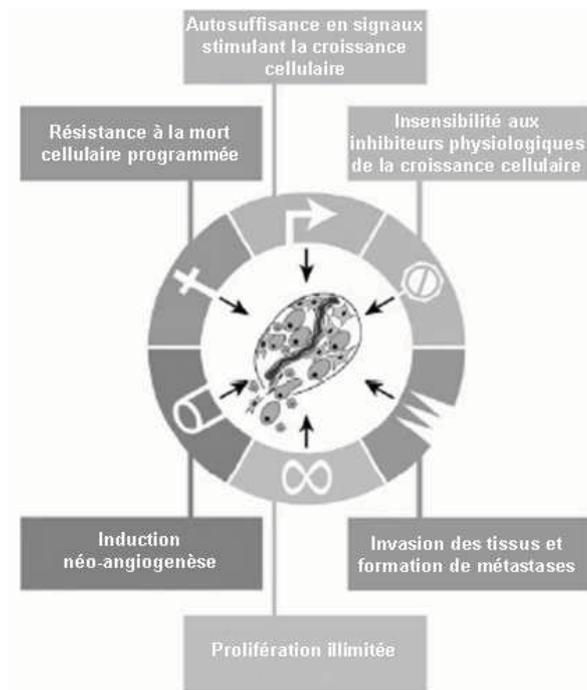


Figure 1 : Propriétés responsables du caractère malin des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2000).

Il n'y a pas d'ordre particulier dans l'intervention de ces modifications, elles s'accumulent pour donner un phénotype cancéreux.

A. Autosuffisance pour les signaux de croissance

Des facteurs de croissance, type Ras et Alb, peuvent être produits par la cellule tumorale et conduisent à une stimulation permanente des voies d'activation de la prolifération cellulaire. La cellule n'a plus besoin d'interagir avec les cellules environnantes pour se multiplier.

B. Perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance

C'est principalement la voie de la « Retinoblastoma Protein » (pRb) qui est altérée. Cette protéine, lorsqu'elle est hypophosphorylée bloque la fonction du facteur de transcription E2F. Ce facteur contrôle l'expression d'un ensemble de gènes essentiels à l'évolution du stade cellulaire de la phase G1 (repos) vers la phase S (mitotique). Si le contrôle par pRb est altéré, E2F induit la prolifération.

C. Echappement à l'apoptose

Une caractéristique commune à toute cellule tumorale est qu'elle peut échapper à la mort cellulaire programmée (ou apoptose), ce qui favorise leur développement. La cellule cancéreuse acquiert plusieurs mécanismes de résistance à l'apoptose. Le plus connu est celui de la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, impliqué dans la régulation pro-apoptotique. La mutation de ce gène, rendu non fonctionnel, est retrouvée dans 50% des cancers.

Récemment d'autres voies anti-apoptotiques altérées ont été mises en évidence telle la voie de signalisation impliquant le récepteur Fas et son ligand Fas-L. Dans les cellules tumorales, le récepteur, « Decoy Receptor » est surexprimé et a une affinité supérieure pour le Fas-L, ce dernier est détourné de son récepteur spécifique (Fas) et donc de sa fonction pro-apoptotique.

On peut également avoir une surexpression de Bcl-2 par translocation d'un gène inhibiteur de l'apoptose. Ceci favorise la prolifération cellulaire : il y aura un déséquilibre constant et donc échappement à l'apoptose.

D. Potentiel de réplication illimité

A chaque division cellulaire, les télomères de chaque extrémité chromosomique se raccourcissent, ce qui limite les capacités de division des cellules à environ 60 ou 70 cycles cellulaires. Au dessous d'un certain point, la perte des télomères conduit à la mort cellulaire. Dans les cellules tumorales on peut avoir une activation de l'enzyme télomérase qui maintient une longueur normale des télomères, ce qui augmente le nombre potentiel de cycle cellulaire indéfiniment. Ce phénotype est acquis dans presque tous les types de cancer.

E. Angiogenèse tumorale

A plus de 3 mm d'un vaisseau, un tissu ne peut pas survivre. La prolifération des vaisseaux est donc nécessaire au développement tumoral. Les cellules sécrètent des facteurs d'angiogenèse (ex : Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) : en parallèle de la croissance tumorale il y a croissance vasculaire.

F. Capacité d'invasion des tissus et de métastases

Pour se propager dans l'organisme, les cellules d'une tumeur solide doivent pouvoir s'échapper du tissu d'origine, creuser au travers d'autres tissus pour rejoindre un vaisseau sanguin ou lymphatique, traverser la lame basale et la paroi endothéliale du vaisseau afin d'entrer dans la circulation, réussir à sortir de la circulation dans une autre région de l'organisme et survivre et proliférer dans leur nouvel environnement. Pour réussir chacune de ces étapes, la cellule et son environnement doivent subir de nombreuses transformations anormales. Entre autres, la perte de l'adhérence intercellulaire intervient à la suite de l'altération de l'expression de la Cadhérine E. La pénétration dans les tissus est le résultat de la surexpression de protéases. Les modifications de l'expression des intégrines favorisent aussi la capacité migratoire des cellules de la tumeur solide.

Chacune de ces propriétés communes à la plupart des cellules cancéreuses peut être utilisée pour le ciblage thérapeutique des virus sur ces cellules pathogènes.

II. Les virus potentiellement utilisables dans la lutte contre le cancer

Un virus oncolytique est un virus qui n'infecte ou ne se réplique que dans des cellules cancéreuses, conduisant à leur lyse et épargnant les cellules non transformées. Certains virus ont naturellement une action oncolytique, d'autres ont été sélectionnés et/ou génétiquement modifiés à cette fin.

A. Virus naturellement oncolytiques

1. *Parvoviridae*

Les parvovirus autonomes infectent un grand nombre de vertébrés et se répliquent au sein de divers tissus caractérisés par une prolifération cellulaire. La capsidie icosaédrique de ces petits virus à ADN est dépourvue d'enveloppe et possède une taille de 20 à 25 nm. Le support de leur information génétique est une molécule monocaténaire et linéaire d'ADN d'environ 5 kb.

Comme pour de nombreux virus à ADN, la réplication des parvovirus requiert des composants cellulaires exprimés de façon transitoire lors de la phase S. Cependant, contrairement aux virus oncogènes à ADN, les parvovirus sont incapables de mener des cellules quiescentes en phase S. Leur cycle réplcatif est ainsi subordonné à l'initiation de la réplication de l'ADN génomique de la cellule hôte. Ce qui explique leur affinité pour les tissus en renouvellement permanent, dont les tissus tumoraux (Deleu et al, 2002).

La libération des particules virales hors de la cellule hôte est consécutive à la perte de l'intégrité de la membrane plasmique.

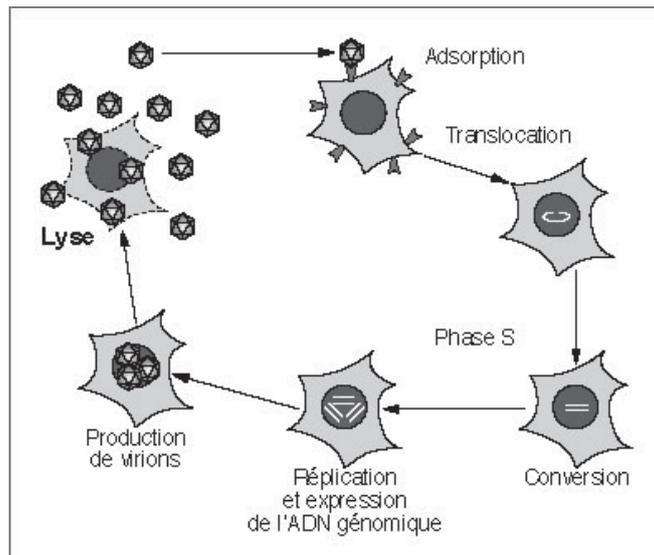


Figure 2 : Cycle lytique des parvovirus (Deleu et al, 2002).

Les étapes initiales d'adsorption et d'internalisation du virus par l'intermédiaire de récepteurs membranaires semblent indépendantes de l'état de prolifération de la cellule hôte. Après sa translocation dans le noyau, le génome viral monocaténaire est converti en forme répliquative bicaténaire par un processus couplé à l'entrée des cellules en phase S. L'ADN viral bicaténaire sert de substrat à la transcription des protéines non structurales nécessaires à une amplification, et des protéines structurales s'assemblent en capsides. La lyse de la cellule hôte libère les particules filles au terme du cycle viral.

Les mécanismes moléculaires de la suppression tumorale induite par les parvovirus restent à identifier. La sélectivité de la lyse parvovirale vis-à-vis des cellules cancéreuses est primordiale dans la perspective d'une utilisation thérapeutique des parvovirus. Deux niveaux de spécificité ont été mis en évidence. D'une part, la transformation cellulaire par des oncogènes exacerbe les propriétés cytotoxiques d'une des protéines virales : NS1. Il s'agit d'une protéine aux effets cytopathiques : des études *in vitro* ont montré qu'une quantité donnée de protéine NS1, inoffensive pour des cellules normales, est toxique pour leurs équivalentes transformées (Deleu et al, 2002). D'autre part, la transformation oncogénique active le cycle parvoviral. En effet, ces cellules transformées se distinguent des cellules normales par leur aptitude à soutenir plus efficacement la réplication et donc l'expression du génome parvoviral.

De plus, en induisant la lyse d'une fraction des cellules néoplasiques, ces virus sont susceptibles de déclencher une réponse immunitaire dirigée contre des antigènes tumoraux. Une telle vaccination expliquerait que des animaux protégés par une infection parvovirale contre une première implantation de cellules tumorales deviennent résistants à long terme à des implantations ultérieures de ces mêmes cellules non infectées (Deleu et al, 2002).

2. Reoviridae

Un des exemples récents de virus oncolytique est celui des réovirus de mammifères. Les réovirus sont des virus sans enveloppe de 60 à 80 nm et possédant une double capsidie protéique. Le génome viral est composé de dix segments d'ARN bicaténaire transcrits par des enzymes présentes dans la capsidie interne du virus. La réplication du génome viral s'effectue par synthèse du brin négatif à partir du brin d'ARN positif, pour former un ARN bicaténaire. Le cycle répliatif des réovirus s'achève généralement par la lyse cellulaire, entraînant le relargage de particules virales (Lemay G. , 2002).

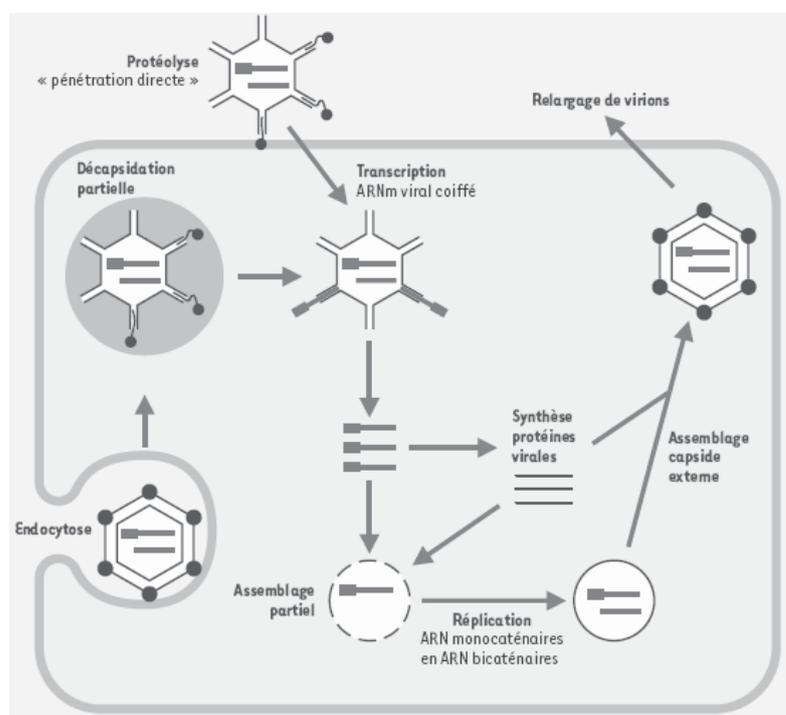


Figure 3. Cycle répliatif du réovirus (Lemay G. 2002) Pénétration du virus par endocytose suivie d'une digestion partielle de la capsidie externe par des enzymes lysosomiales permettant la traversée de la membrane endosomique par le virus. On peut également avoir une protéolyse dans le tractus intestinal et pénétration transmembranaire directe du virus. Transcription du génome viral par des enzymes virales présentes dans la capsidie interne du virus. L'ARN messenger viral libéré dans le cytoplasme permet la synthèse des protéines virales, suivie de leur assemblage et de la reconnaissance d'une copie de chacun des ARN viraux afin de former une nouvelle particule (assemblage partiel). La capsidie externe sera finalement ajoutée afin de produire des virions complets et infectieux qui seront libérés par lyse cellulaire.

La réplication dans les cellules normales est habituellement bloquée par l'activation de la protéine kinase R (PKR). En effet, la présence de double brin d'ARN dans la cellule

infectée active la PKR qui phosphoryle eIF2 α bloquant ainsi la synthèse protéique cellulaire. Ceci peut mener à la mort cellulaire, limitant ainsi la progression du virus. Cependant, dans les cellules cancéreuses, l'activation du proto-oncogène Ras (cf I.A.) inhibe la PKR, ce qui permet la réplication virale et entraîne la destruction des cellules infectées (Lemay G. 2002).

3. *Rhabdoviridae*

Le Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV) est un virus enveloppé de la famille des *Rhabdoviridae*. Les *Rhabdoviridae* se présentent sous la forme d'un bâtonnet d'une longueur variable de 120 à 180 nm avec une extrémité plate et l'autre arrondie, leur conférant un aspect en "balle de revolver" tout à fait caractéristique. Leur génome est constitué d'un ARN de polarité négative, non segmenté de 12 kb.

Le virus se fixe à la cellule et est endocyté, l'enveloppe fusionne avec la membrane de l'endosome et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. L'ARN viral est transcrit en ARN messagers qui sont traduits en protéines. Les différentes particules s'assemblent et le virus néoformé bourgeonne à la surface de la cellule. La totalité du cycle est intracytoplasmique (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

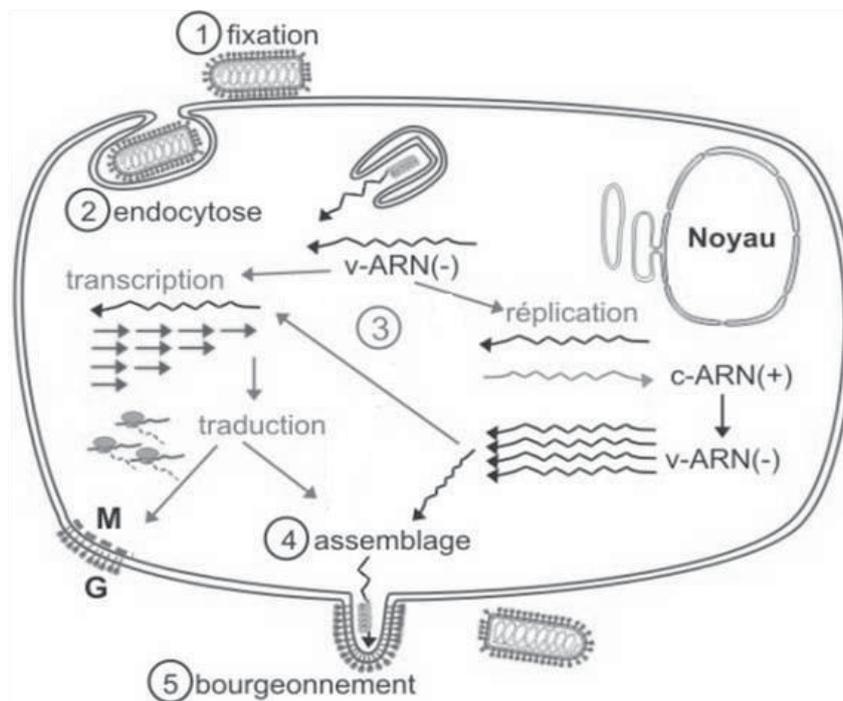


Figure 4. Représentation schématique du cycle d'un *Rhabdoviridae*

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/rhabdoviridae.html>

Le VSV est très sensible à l'inhibition de la synthèse d'ARNm par l'interféron α , ce qui favorise sa multiplication dans les cellules tumorales ayant un défaut dans la voie d'activation des interférons (Szelechowski et Saïb 2005).

4. *Paramyxoviridae*

Les paramyxovirus sont des virus à ARN négatif enveloppés de forme plus ou moins sphérique. La taille moyenne des particules est d'environ 200 nm. L'enveloppe dérive pour sa partie lipidique de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte. Des spicules glycoprotéiques d'hémagglutinine - neuraminidase (HN) (encore nommé G ou H selon les genres), ainsi que des glycoprotéines F sont insérées sur sa face externe (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

Le virus se fixe aux récepteurs des cellules par les spicules HN/G/H. La glycoprotéine F induit la fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le virus est alors décomposé en ses différents constituants. La totalité du cycle se déroule dans le cytoplasme. Deux fonctions sont assurées par l'ARN polymérase virale: la transcription en ARN messagers et la réplication du génome. L'assemblage des génomes et des nucléocapsides a lieu dans le cytoplasme. Parmi les protéines d'enveloppe, la protéine M se dépose sur la face interne de la membrane cytoplasmique tandis que les spicules HN et F s'y insèrent prenant la place des protéines membranaires qui sont exclues de la région de bourgeonnement. Les nucléocapsides s'évagent et les particules virales ainsi néoformées quittent la cellule par bourgeonnement emportant avec elles une partie de la membrane cytoplasmique et les spicules HN et F qui s'y trouvent formant ainsi l'enveloppe du virus (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

En culture, les paramyxovirus provoquent la formation de syncytiums qui sont des groupements cellulaires multinucléés résultant de la fusion des membranes cytoplasmiques de plusieurs cellules sous l'action de la protéine F. L'infection peut donc s'étendre (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

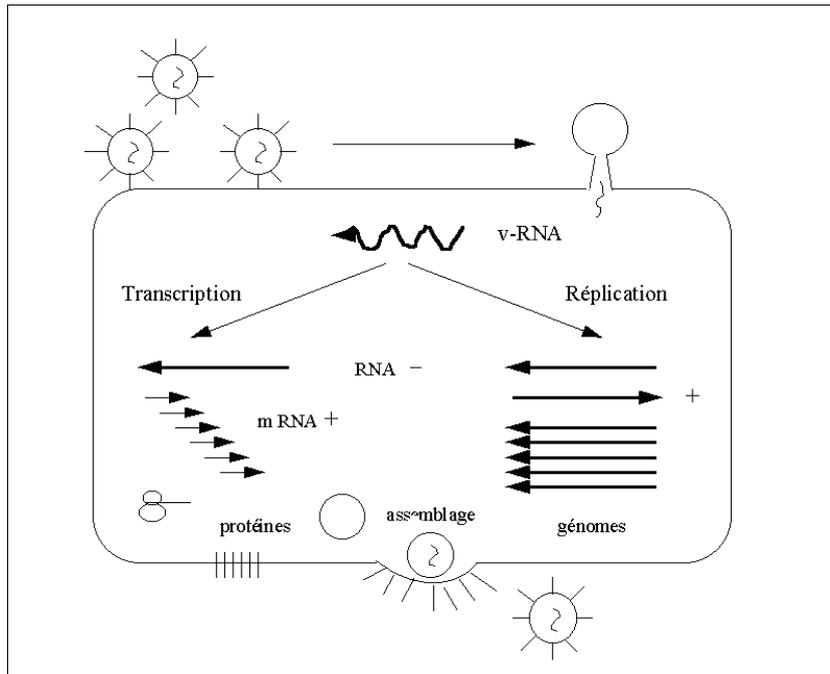


Figure 5. Cycle de réplication d'un Morbillivirus
<http://anne.decoستر.free.fr/d1viro/vparamyx.html>

Le principal représentant de cette famille en ce qui concerne la virothérapie oncolytique en cancérologie humaine est le virus de la maladie de Newcastle (NDV), du genre Avulavirus, une maladie aviaire majeure et une zoonose mineure. Il est utilisé non seulement en tant que virus vivant mais également sous forme d'oncolysats (cf III.B.1.). De même que pour les réovirus, la sélectivité du NDV pour les cellules cancéreuses s'explique par l'activation de la voie Ras (Szelechowski et Saïb, 2005).

Le virus de la maladie de Carré (Canine Distemper virus CDV) est un virus canin de la famille des *Paramyxoviridae*, du genre Morbillivirus, dont fait partie également le virus de la rougeole humaine. Suite à l'infection par ce type de virus on constate chez les animaux atteints une lymphopénie prononcée dont le mécanisme reste peu connu. En conséquence l'utilisation d'une souche atténuée de CDV a été proposée comme traitement pour les lymphomes canins (Arendt et al, 2009).

5. *Circoviridae*

Le virus de l'anémie du poulet, Chicken anemia virus (CAV), est le seul représentant du genre Gyrovirus de la famille de *Circoviridae*. Il s'agit d'un virus à symétrie icosaédrique, non enveloppé, de 25 nm de diamètre. Son génome de 2-3 kb est constitué d'un ADN circulaire simple brin et code pour 3 protéines virales (VP).

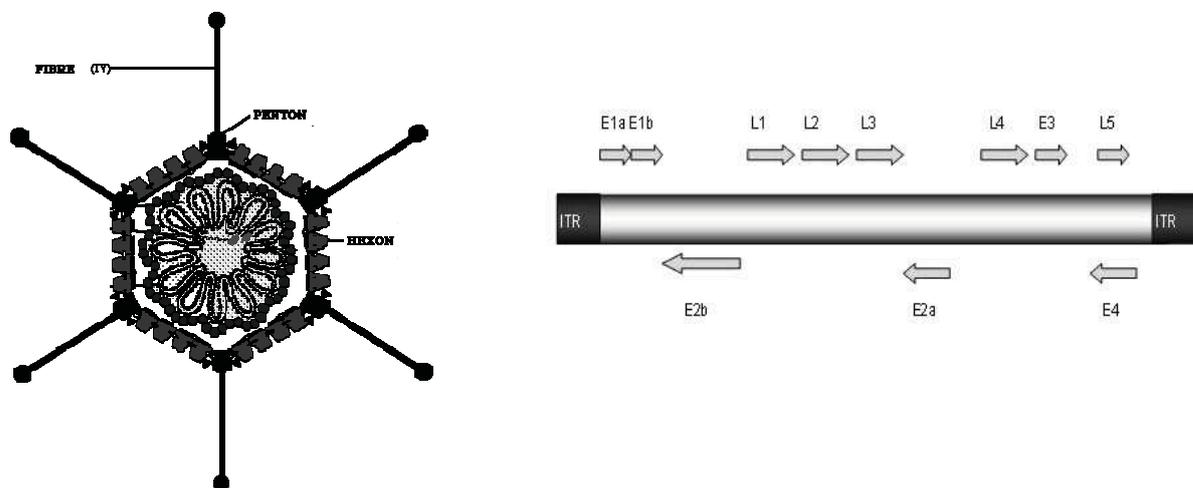
La VP3, ou Apoptine, est une protéine non structurale qui a pour caractéristique d'induire l'apoptose des cellules infectées et ce même dans les cellules défectueuses en p53 comme les cellules cancéreuses. De plus la surexpression de Bcl 2, retrouvée dans certaines cellules tumorales (cf I.D.), stimule l'apoptose induite par l'Apoptine. En revanche il a été constaté que cette protéine ne déclenchait pas d'apoptose sur des cellules humaines normales, ce qui fait du CAV un agent oncolytique potentiel.

Le mécanisme d'action de l'Apoptine est encore peu connu, il semblerait qu'elle interagisse avec la chromatine et déclenche l'apoptose en perturbant sa structure globale ou en agissant comme une endonucléase. Une autre possibilité serait qu'elle active la transcription de gènes apoptotiques (Noteborn et al, 1998).

B. Virus génétiquement modifiés

1. Adenoviridae

Les adénovirus sont des virus non enveloppés dont le génome est entouré d'une capsidie protéique à symétrie icosaédrique, composée majoritairement de trois structures : hexon, penton et fibre. Il s'agit de virus à ADN double brin linéaire de 26 à 45 kb selon les espèces virales. Les premiers gènes exprimés appelés « early genes » (E1A, E1B,...) sont essentiels à la réplication des adénovirus. Les suivants, appelés « late genes » (L3, L2,...) codent pour les protéines de la capsidie (Kakarainen et Hemminki, 2005).



La liaison fibre/récepteur cellulaire (CAR) est essentielle à la pénétration par endocytose du virus dans la cellule hôte. La décapsidation se fait dans l'endosome et le génome viral pénètre dans le noyau sans s'intégrer au génome cellulaire. Le génome viral peut alors être transcrit et répliqué, ce qui aboutit à la formation de plusieurs virions et à terme à leur libération via la lyse de la cellule hôte. Le cycle se déroule rapidement et la cellule est lysée en 20 à 24 heures (Kakarainen et Hemminki, 2005),.

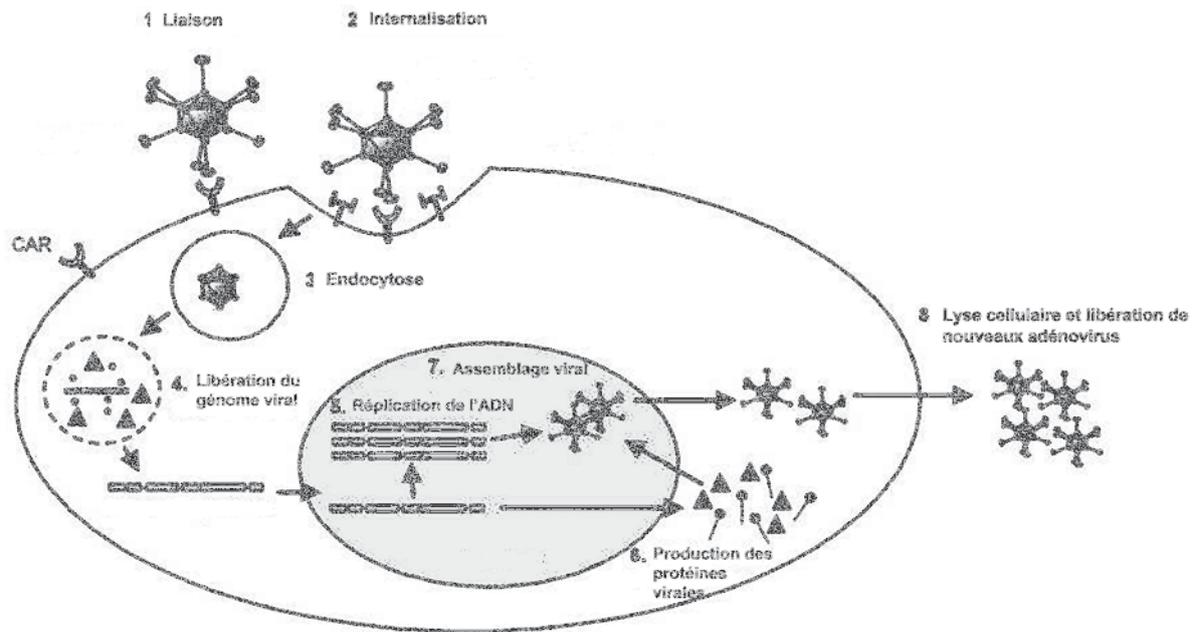


Figure 7. Cycle de réplication d'un adénovirus (Kakkarainen et Hemminki 2005)

Les adénovirus sont les virus les plus étudiés dans le cadre de la lutte contre le cancer. En effet ils ont plusieurs atouts qui les rendent idéaux pour cette utilisation (Kakarainen et Hemminki, 2005):

- ce sont des virus à ADN double brin ce qui les rend plus facilement manipulables de par une stabilité accrue du matériel génétique
- leur génome est bien connu et relativement grand ce qui permet l'insertion de transgènes assez conséquents
- c'est une grande famille qui possède un très large spectre d'infection
- de nombreux adénovirus sont en circulation, communément présents dans l'environnement, et relativement peu pathogènes ce qui diminue les risques à travailler avec ces virus
- le génome viral s'il est exprimé dans le noyau ne s'intègre pas à l'ADN cellulaire réduisant les risques de mutation ou d'insertion des transgènes dans une zone inactive
- leur cycle cellulaire conduit à la lyse rapide de la cellule infectée et simultanément à la libération de nombreux nouveaux virions.

Aujourd'hui ils sont principalement utilisés de deux façons : comme vecteurs de gènes thérapeutiques directement au sein de la cellule tumorale (cf. III. C. 2.), mais aussi en tant que virus oncolytiques génétiquement modifiés pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Dans ces deux cas, le ciblage des cellules tumorales va se faire préférentiellement au niveau de la réplication virale : on parle alors d'adénovirus conditionnellement répliatifs (Conditionnally Replicative Adenoviruses CRAAs). L'utilisation de ces CRAAs est basée sur leur capacité théorique à se répandre dans la tumeur tant que des cellules tumorales persistent, de par le relargage de nouveaux virions par les cellules lysées (Kakarainen et Hemminki, 2005).

Un des moyens les plus utilisés pour restreindre la réplication des adénovirus aux cellules cancéreuses est la délétion des gènes viraux en région E1A ou B. Ces gènes sont essentiels au virus pour contrecarrer les moyens de défenses cellulaires présents dans les cellules saines de l'organisme et déficients dans les cellules cancéreuses comme les voies de régulation de l'apoptose cellulaire par p53 ou le blocage de la réplication par p(Rb), etc... (Fig.8). Ainsi le virus peut infecter les cellules sans distinction aucune mais ne pourra se répliquer, et donc conduire à la lyse de la cellule hôte, que si celle-ci est cancéreuse (Kiritsis et al 2009).

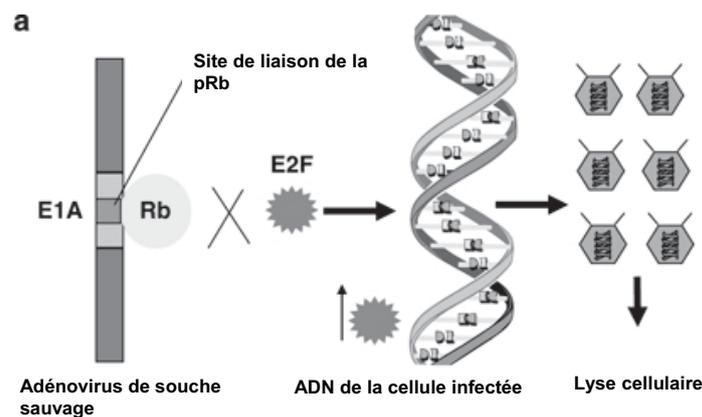
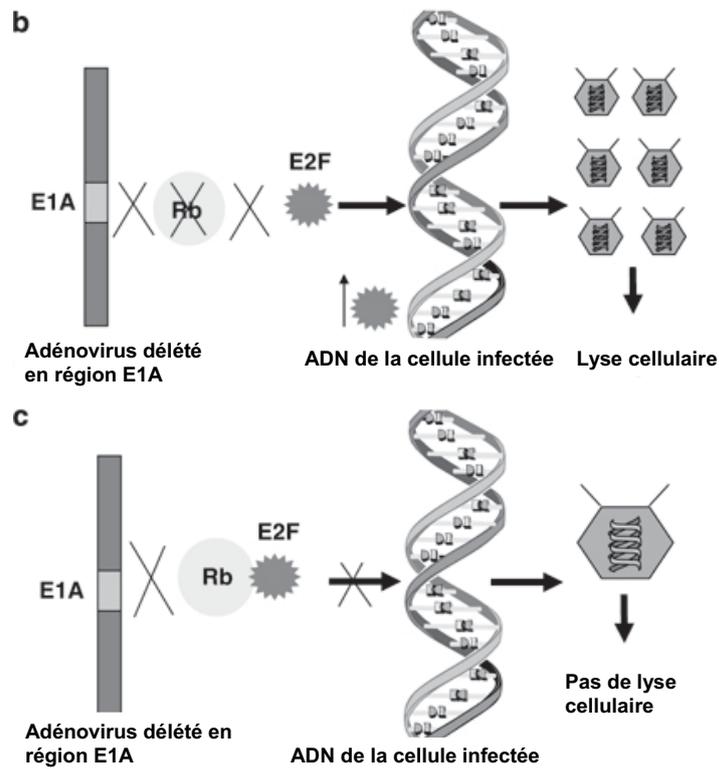


Figure 8. Mécanisme de fonctionnement simplifié d'un CRAA (Kiritsis et al, 2009) (a) Réplication d'un adénovirus sauvage dans une cellule normale. La liaison des protéines virales E1A à la p(Rb) libère le facteur E2F en supprimant le complexe existant à l'état physiologique dans la cellule : E2F-Rb. L'E2F libéré active le promoteur adénoviral E2 ce qui permet la transcription du génome viral dans la cellule. Il y a réplication virale et donc lyse cellulaire.



(b) Réplication d'un CRAd dans une cellule cancéreuse déficiente en p(Rb). Le CRAd ne possède plus de E1A et ne peut donc se lier à p(Rb). Cependant la cellule cancéreuse est déficiente en p(Rb) ce qui permet l'initiation de la réplication virale par les E2F non liés. On aboutit à la lyse cellulaire. **(c)** Réplication d'un CRAd dans une cellule normale avec p(Rb). L'absence de E1A ne permet pas au virus de séparer le complexe E2F-p(Rb) ce qui rend impossible la réplication du virus et donc la lyse cellulaire.

Une autre méthode consiste à insérer dans le génome viral un promoteur tumeur-spécifique pour contrôler l'expression de gènes nécessaires à la réplication (cf partie 2 I.C.1.)

2. Retroviridae

Les rétrovirus sont des virus enveloppés, appartenant à deux familles (*Orthoretrovirinae* et *Spumaretrovirinae*), et sept genres. Leur génome est constitué de deux copies d'ARN simple brin positifs de 7 à 11 kb.

Le virus s'attache à la cellule-hôte via un récepteur qui provoque la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et la libération de la capsid virale dans le cytoplasme. Le génome viral est alors libéré et dupliqué sous forme d'ADN par une reverse transcriptase virale. L'ADN ainsi produit est transporté jusqu'au noyau par migration passive le plus souvent, mais active pour les lentivirus, où il s'intègre au génome de la cellule. La machinerie cellulaire produit alors l'ARN viral qui sert aussi d'ARNm pour la production des protéines virales. Après assemblage, les nouveaux virions créés peuvent bourgeonner à la surface de la cellule (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

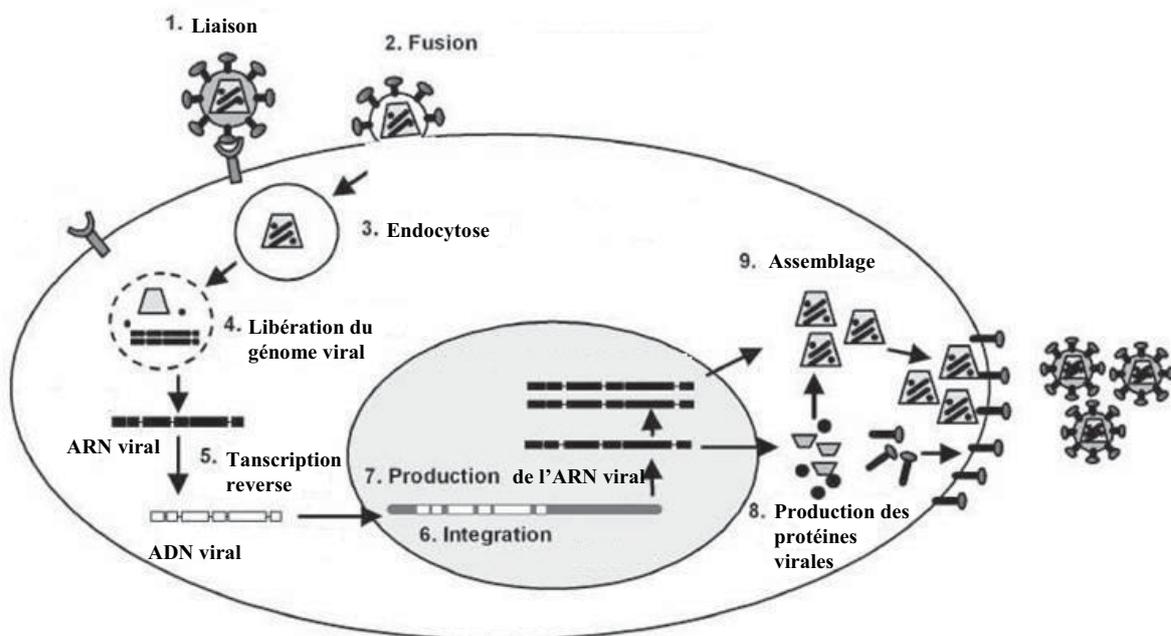


Figure 9. Cycle (Hakkarainen et Hemminki, 2005)

Les rétrovirus ont été les premiers virus à être utilisés dans les études cliniques humaines. D'abord parce que leur génome est assez simple ce qui rend les manipulations requises pour la production des vecteurs viraux plus aisée. De plus, leur capacité à s'intégrer dans le génome de la cellule-hôte peut assurer une expression à long terme des transgènes dans les cellules ciblées. Cependant cette intégration ne permet pas toujours d'avoir une expression stable du transgène et peut augmenter le risque de mutation par insertion. Enfin les rétrovirus n'engendrent pas de fortes réponses immunitaires ce qui réduit leur cytotoxicité et

permet une réadministration des vecteurs. En revanche ils sont rapidement dégradés par le complément (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

Le principal facteur limitant dans l'utilisation des rétrovirus est leur incapacité à être transduits dans les cellules en phase de repos, à l'exception des lentivirus capables de transduction dans toutes les étapes du cycle cellulaire.

Du fait de la petite taille du génome viral la totalité des gènes viraux sont remplacés par le transgène désiré et son promoteur. Des constructions séparées apportent les protéines nécessaires à la fonctionnalité du vecteur viral, ce qui minimise la probabilité de revenir à une réplication virale compétente et augmente en conséquence la sécurité d'utilisation de ces vecteurs (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

Bien que l'utilisation des rétrovirus soit surtout focalisée sur les maladies génétiques pour lesquelles une expression stable et de longue durée du transgène est requise, plusieurs études cliniques en médecine humaine ont porté sur les cancers. Du fait de l'incapacité des vecteurs rétroviraux à être transduits dans des cellules non prolifératives, la thérapie par gène suicide a été étudiée notamment dans le traitement des tumeurs cérébrales et pulmonaires. Dans des études préclinique, les lentivirus ont également été évalués pour différents types de cancer (ovariens, prostate, vessie). Cependant des problèmes de biosécurité empêchent à ce jour la réalisation d'essais cliniques avec des lentivirus qui peuvent être transduits également dans les cellules en repos (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

3. *Herpesviridae*

Il existe un grand nombre d'herpesvirus chez différentes espèces animales, ainsi nous nous limiterons ici à l'herpès humain de type 1 (HSV1), encore appelé *Herpès Simplexvirus*, qui est le plus utilisé pour la thérapie génique contre le cancer. Ce sont de gros virus, enveloppés, de 100 à 200 nm de diamètre, à ADN double brin linéaire. La taille du génome viral est elle aussi très importante variant de 125 à 240 kb.

L'entrée du virion dans la cellule est dépendante de la spécificité des glycoprotéines vis-à-vis des récepteurs présents à la surface cellulaire et requiert la fusion des membranes cellulaires avec l'enveloppe virale. La capsid virale migre dans le cytoplasme jusqu'au noyau où le génome viral est libéré. Il se circularise et peut alors être transcrit, ou entrer en latence. Les nouvelles capsides produites sont assemblées au niveau de l'appareil de Golgi et sortent de la cellule par exocytose (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

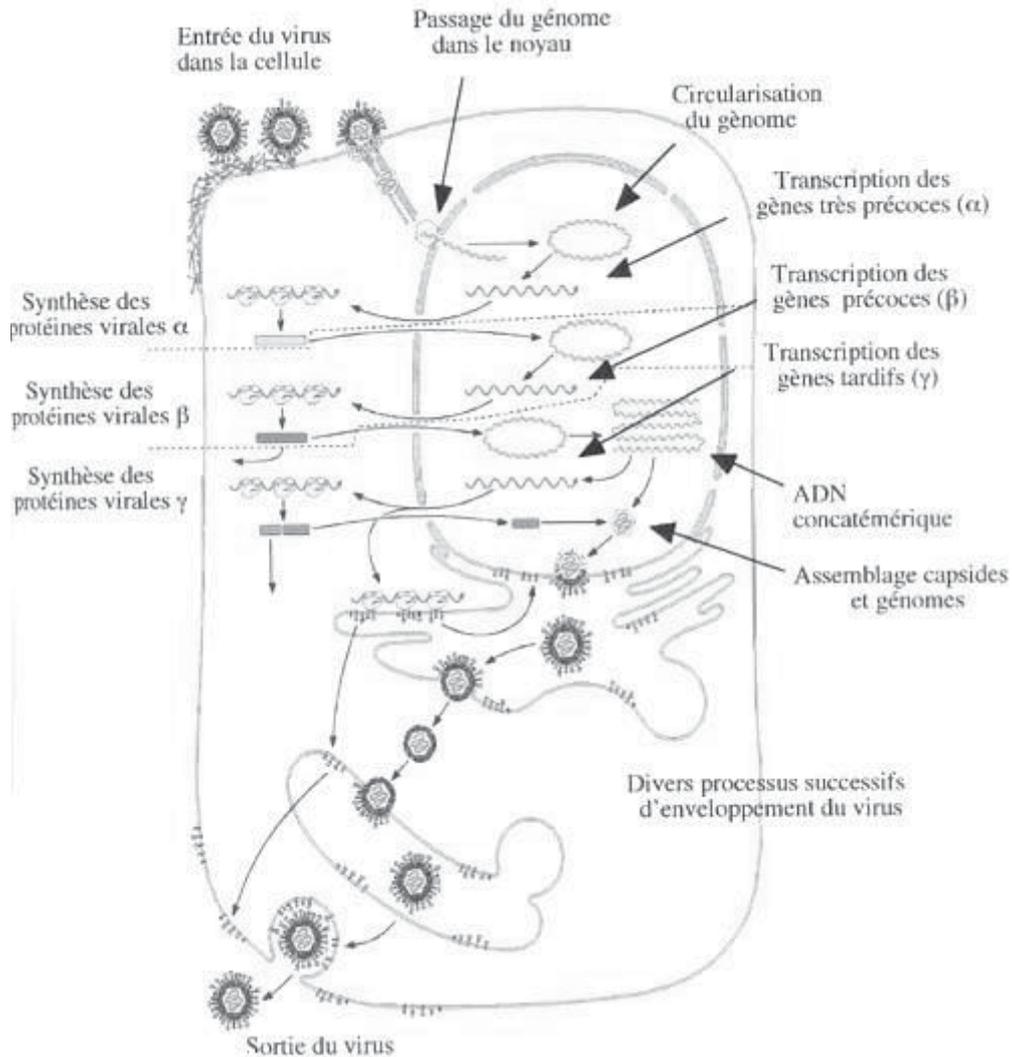


Figure 10. Cycle de réplication d'un herpesvirus (Collot-Teixeira, 2003)

Lors d'une phase de latence le génome viral est présent dans le noyau mais ne s'y réplique pas, jusqu'à ce qu'un stress extérieur déclenche la réplication.

Historiquement, les HSV ont servis de prototypes pour le développement des virus oncolytiques génétiquement modifiés. En effet, ils ont un spectre d'infection extrêmement large, un cycle lytique et surtout une sécurité d'utilisation car en cas de réplication indésirable du virus des antiviraux existent pour cette famille de virus (Collot-Teixeira, 2003).

Etant donné la taille importante du génome, les manipulations/délétions géniques utilisées ou testées sont très nombreuses. Parmi celles-ci on peut citer notamment la délétion du gène $\gamma 34.5$. Comme nous l'avons vu avec les réovirus, une des voies de défense cellulaire passe par l'activation de la PKR et la phosphorylation d'eIF2 α (cf. II.1.b.). Le virus HSV-1,

comme beaucoup de virus, a évolué pour empêcher cette phosphorylation d'eIF2 α en bloquant la fonction PKR. Le produit du gène γ 34,5 du virus HSV-1 se lie à une phosphatase et ce complexe, en déphosphorylant la sous-unité α d'eIF2, la maintient ainsi active. Un virus ayant subi une délétion du gène γ 34,5 ne pourra donc se répliquer que dans des cellules où la PKR est inactive dont font partie les cellules tumorales.

Un autre exemple utilise le gène codant pour la thymidine kinase (TK). Cette enzyme est essentielle à la transcription du génome viral et est présente dans les cellules en cours de réplication. Si on supprime le gène codant pour la TK virale, l'apport de TK ne dépend alors plus que de la cellule et est donc fortement corrélé à l'état mitotique de celle-ci. Le virus se réplique ainsi préférentiellement dans les cellules en prolifération (Varghese et Rabkin, 2002).

4. Poxviridae

Les poxvirus sont des virus enveloppés de grande taille (200 à 450 nm de long). Ils sont constitués d'une enveloppe externe recouvrant un ensemble, et d'une enveloppe interne entourant la capsidie protéique. Leur génome est formé d'un ADN bicaténaire linéaire de 130 à 375 kpb (d'après Van Regenmortel et al, 2000).

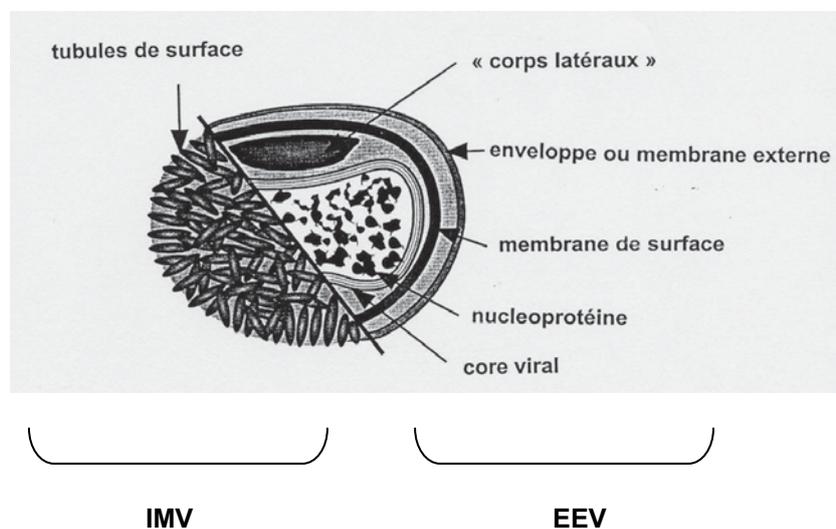


Figure 11 : Représentation schématique des poxvirus (sauf *Parapoxvirus*) (d'après Van Regenmortel et al, 2000)

Le cycle de réplication est très court (16 à 20h). Après liaison à la membrane de la cellule, le virus pénètre par diverses voies, libérant ainsi le core dans le cytoplasme. Il y a ensuite décapsidation et réplication de l'ADN viral avec synthèse des ARNm codant pour les protéines virales. Après production de ces protéines virales il y a assemblage puis

enveloppement des nouveaux virions. Ce cycle se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Eloit, 2007).

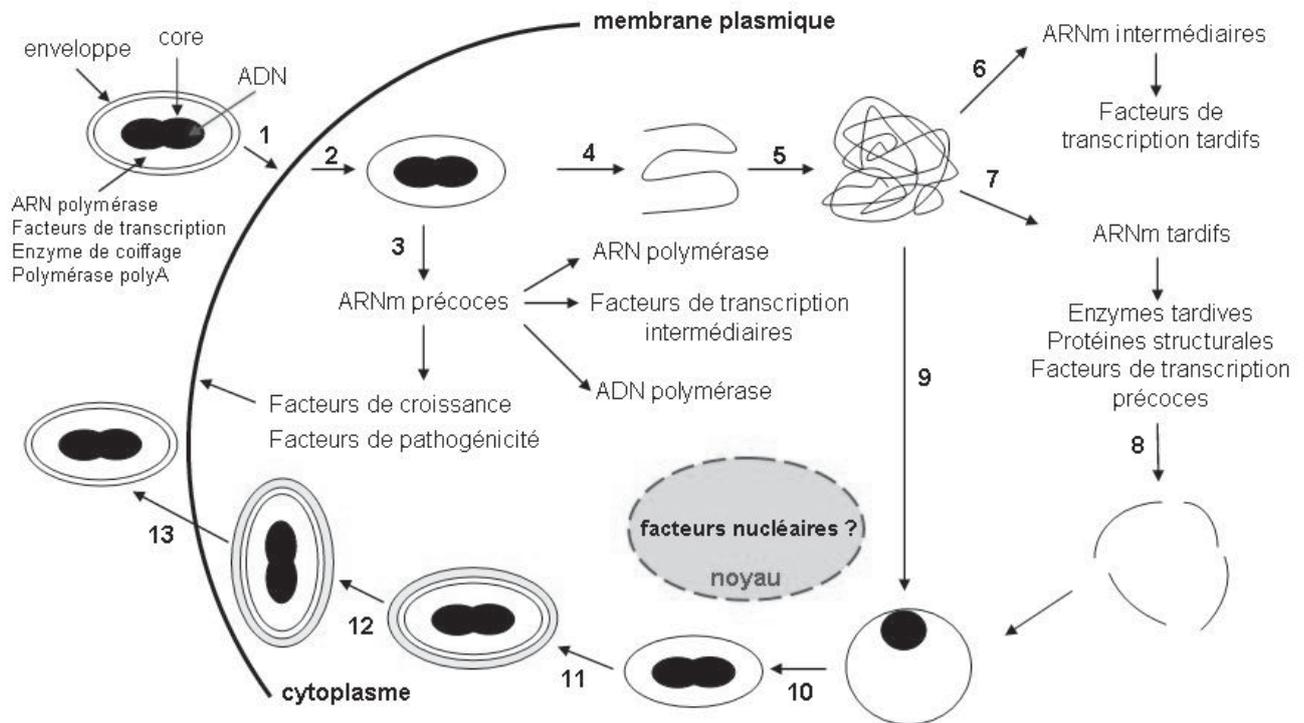


Figure 12 : Cycle de réplication des poxvirus. 1 : attachement à la cellule ; 2 : pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme ; 3 : transcription des gènes précoces ; 4 : déshabillage du core ; 5 : réplication de l'ADN et formation de concatémères ; 6 : transcription des gènes intermédiaires ; 7 : transcription des gènes tardifs ; 8 : début de l'assemblage avec les premiers fragments de membrane ; 9 : résolution des concatémères et incorporation d'ADN ; 10 : maturation et formation des IMV ; 11 : acquisition d'une double enveloppe (IEV) ; 12 : migration vers la surface cellulaire à l'aide du cytosquelette ; 13 : fusion avec la membrane plasmique cellulaire, formation des CEV et libération d'EEV (Moss, 2001), (d'après Van Regenmortel et al, 2000)

Outre un temps de réplication très court (16 à 20h), les vecteurs recombinés basés sur des poxvirus offrent des possibilités quasi illimitées pour la manipulation génétique du fait de la grande taille de leur ADN. Le virus de la vaccine en particulier, du genre *Orthopoxvirus*, est aujourd'hui étudié dans le cadre de la lutte contre le cancer.

Le virus de la vaccine possède un très large spectre de cellules hôtes. Il exprime un facteur de croissance soluble qui présente une activité mitogène, facilitant l'infection des cellules voisines. Une délétion du gène codant pour ce facteur permet donc de limiter la propagation du virus aux zones très mitotiques, telles que les tumeurs. Les propriétés oncolytiques sont également potentialisées lorsque la délétion affecte le gène codant la TK virale (de même que pour les vecteurs herpétiques) (Gentschev I et al, 2009).

III. Différents modes d'action

A. Oncolyse virale directe

1. Destruction directe par la réplication virale

Comme nous l'avons vu précédemment, certains virus sont capables de conduire directement à la lyse tumorale par le détournement du métabolisme cellulaire et par l'accumulation de virions.

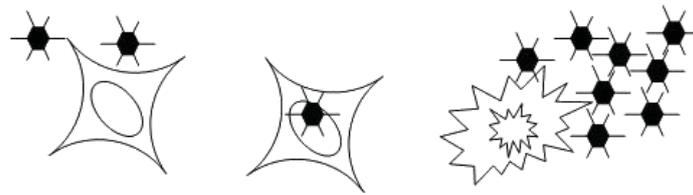


Figure 13. Représentation schématique de l'action oncolytique d'un virus (Arendt et al, 2009)

De plus, la libération de ces nouveaux virions permet l'invasion des cellules adjacentes ainsi qu'une augmentation continue de la charge virale, jusqu'à l'intervention d'une réponse immunitaire de l'hôte ou la pénurie de cellules sensibles proches (Arendt et al, 2009).

2. Protéines virales oncotoxiques

Certaines protéines virales sont toxiques pour les cellules tumorales et peuvent conduire à la mort cellulaire. Il s'agit majoritairement de protéines non structurales. Le mécanisme d'action précis de ces protéines reste encore à déterminer, cependant leur accumulation conduit à la lyse cellulaire dans les cellules transformées.

Il y a par exemple la protéine NS1 produite par les parvovirus. Elle agirait au niveau des facteurs de transcription. Divers promoteurs hétérologues, en particulier cellulaires, se sont avérés inhibés ou induits en présence de NS1. Ces observations suggèrent que l'action toxique de NS1 pourrait résulter, du moins en partie, du dérèglement de la transcription de certains gènes cellulaires (Deleu et al, 2002).

La protéine VP3 ou Apoptine produite par le CAV, comme vu précédemment (II. A.5.), semble devoir interagir avec les nucléotides de la cellule pour induire l'apoptose des cellules infectées, et ce même dans les cellules défectueuses en p53 comme les cellules cancéreuses (Noteborn et al, 1998).

B. Induction d'une immunité anti-tumorale

Les cellules tumorales sont pour la plupart très peu immunogènes du fait de la faible expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou des médiateurs de la réponse immunitaire (cytokines). Certaines protéines virales rétablissent cette immunogénicité en induisant une immunité antitumorale spécifique qui permet la régression de la tumeur (Kerzhero, 2009).

1. Oncolysats

Des lysats de cellules tumorales infectées, appelés oncolysats et utilisés comme préparations thérapeutiques, permettent de combiner l'efficacité des virus oncolytiques et une immunité active « tumeur-spécifique ».

Ces oncolysats ont pour effet d'induire une réponse immunitaire de type humoral contre les antigènes viraux et les antigènes tumoraux révélés par l'infection virale. Ainsi, en induisant la lyse d'une fraction des cellules néoplasiques, les virus sont susceptibles de déclencher une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes tumoraux (Kerzhero, 2009).

Cette piste est notamment très intéressante dans la recherche de vaccins contre le cancer. En effet le déclenchement d'une réponse immunitaire humorale permet grâce à la mémoire immunologique de l'organisme le développement d'une résistance à long terme.

2. Synthèse et présentation d'Ag viraux sur les cellules tumorales

L'infection virale de cellules tumorales peut par exemple induire la production de facteurs diffusibles capables d'activer les cellules présentatrices de l'antigène. Les molécules HLA-I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. Elles présentent des peptides antigéniques, issus de la dégradation intracellulaire des protéines endogènes normales ou pathologiques (protéines mutées ou protéines virales), qui peuvent être reconnus spécifiquement par des T_H CD8⁺. Ces derniers peuvent alors détecter d'autres cellules qui expriment ces peptides pour les éliminer de l'organisme (Kerzhero, 2009).

Ce système de surveillance sophistiqué dépend de l'activité du protéasome 26S, responsable de la dégradation des protéines au niveau du cytoplasme. Cette voie de

dégradation cytosolique est la voie majeure de présentation des Ag par les molécules HLA-I (Fig. 15). Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'immunoprotéasome pourrait être plus efficace pour la présentation des peptides d'origine virale et qu'il pourrait influencer la spécificité de la réponse immunitaire. Ainsi en dirigeant un virus immunogène sur les cellules cancéreuses par un ciblage au niveau de l'infection, on induit une immunité anti-tumorale via une présentation d'Ag viraux déclenchant une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses uniquement (Kerzhero, 2009).

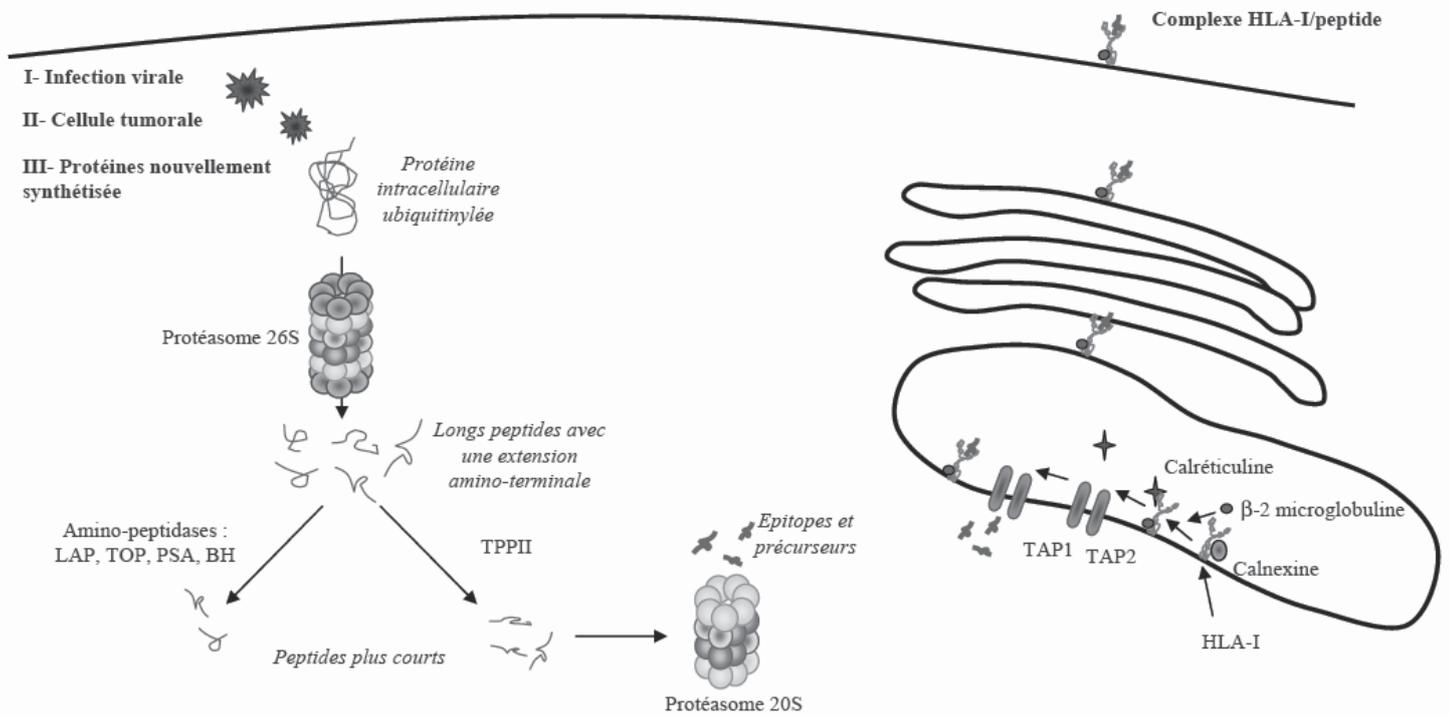


Figure 14. L'apprêtement des antigènes viraux par les molécules HLA- I
(Kerzhero, 2009)

C. Vecteurs de transgènes thérapeutiques

1. Principe

Les virus sont des vecteurs naturels, hautement évolués, et d'une efficacité redoutable pour pénétrer dans les cellules hôtes, transférer leur matériel génétique et exploiter la machinerie cellulaire pour leur réplication. Par conséquent, un autre mécanisme par lequel des virus peuvent avoir un effet oncolytique est l'expression de transgènes thérapeutiques insérés dans le génome viral ou le remplaçant carrément.

Ces techniques permettent d'introduire un « gène médicament » dans une cellule cancéreuse *via* un virus inactivé. Les inserts peuvent être de diverses natures : des drogues antitumorales, des cytokines qui vont stimuler la réponse immunitaire, des gènes-suicides (cf 3.), etc. La cellule tumorale infectée est ainsi attaquée par plusieurs voies. De plus, les modifications génétiques, comme les délétions, permettent également d'atténuer la pathogénicité initiale de la souche virale sauvage et de rendre plus sûre l'utilisation du virus en tant que vecteur.

2. Ciblage des vecteurs au niveau de l'infection

L'obstacle majeur en thérapie génique est toujours la transcription insuffisante du transgène (Hakkarainen et Hemminki, 2005). Afin de contourner le manque de sélectivité de ces vecteurs pour les tumeurs, plusieurs stratégies ont été développées pour que la sélection se fasse au moment de l'infection cellulaire. Cela permet non seulement d'améliorer le transfert mais aussi d'éviter la pénétration du virus et donc les effets secondaires dans les tissus sains.

De nombreux récepteurs cellulaires sont surexprimés sur les cellules cancéreuses et moins présents sur les cellules saines. Il en est de même pour certains antigènes tumoraux (Tumor Associated Antigens, TAA) présents essentiellement sur les cellules tumorales. On peut donc envisager deux types de ciblage différents.

Le premier consiste à modifier les protéines de surface du virus vecteur pour lui faire présenter des peptides ciblant des récepteurs spécifiques à la surface des cellules cancéreuses. Cette technique est notamment employée avec les adénovirus. Des éléments de ciblage sont

introduits par génie génétique en modifiant les fibres virales essentielles à la pénétration du virus dans la cellule cible (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

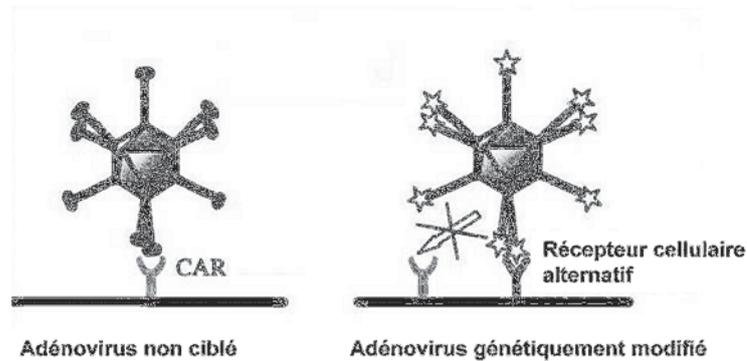


Figure 15. Ciblage d'un adénovirus (Hakkarainen et Hemminki, 2005) De par la modification des fibres de sa capside, l'adénovirus qui se lie en général au récepteur CAR est redirigé sur un récepteur exprimé par les cellules tumorales.

Le second moyen de ciblage consiste à coupler à la surface des virus des anticorps bi-fonctionnels reconnaissant d'un part une protéine de l'enveloppe du virus et d'autre part des récepteur des cellules cibles ou des TAA (Foillard 2008).

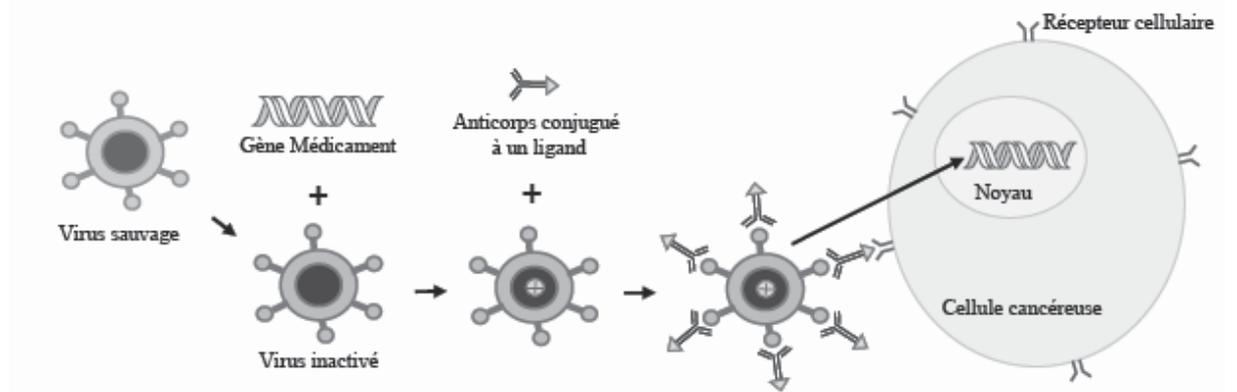


Figure 16. Principe d'utilisation des vecteurs viraux ciblés pour la thérapie génique (Foillard, 2008).

3. Principe de la thérapie gène suicide

Un gène suicide code pour une enzyme capable de métaboliser une pro-drogue non toxique en métabolites cytotoxiques induisant la mort des cellules transfectées. Une cellule transfectée par un gène suicide suffit à détruire une population cellulaire. La diffusion passive du métabolite cytotoxique à travers la membrane plasmique ou par des jonctions inter-cellulaires (type jonctions GAP) lui permet d'agir sur les cellules avoisinantes n'exprimant pas le transgène : c'est l'effet bystander (Gretillat 2009).

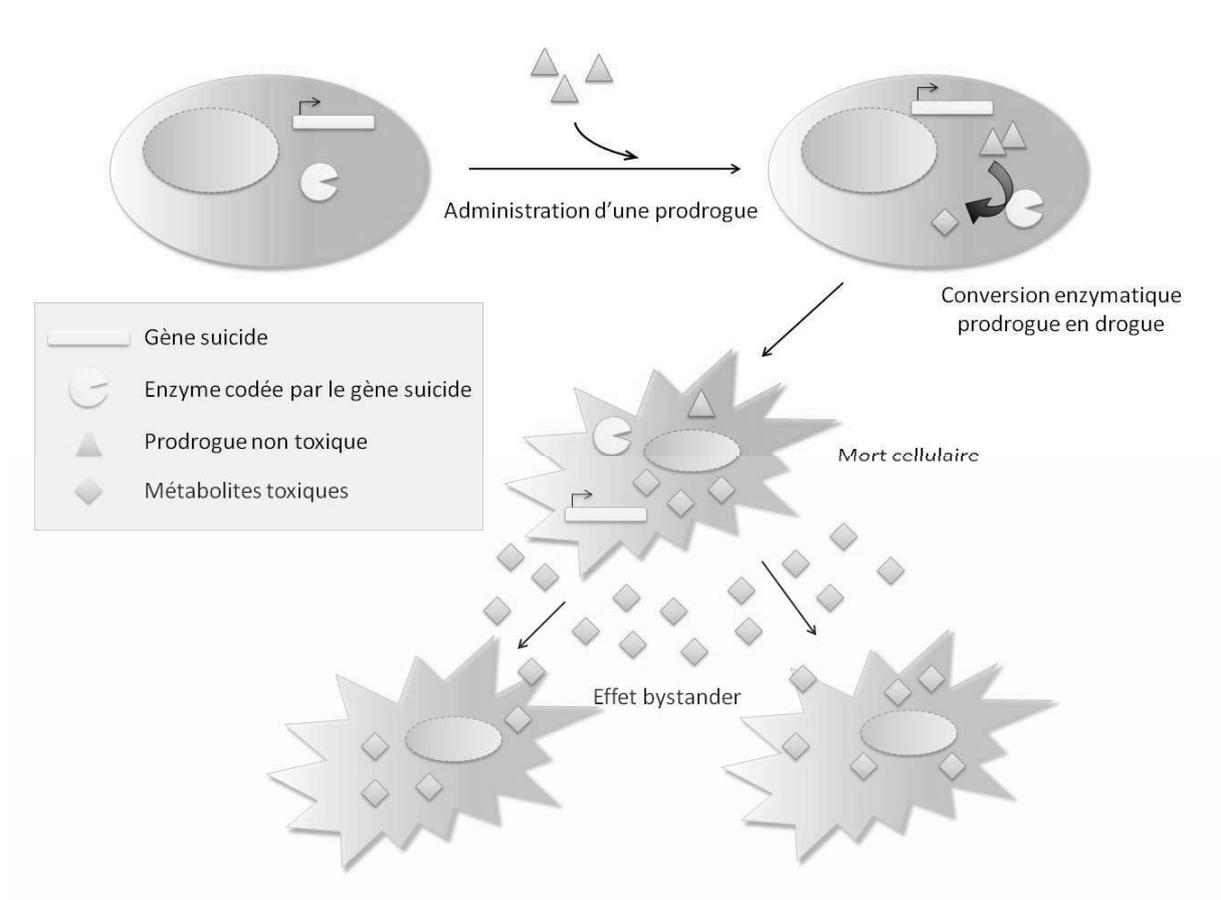


Figure 17. Représentation schématique de l'action d'un gène suicide (Gretillat 2009)

Le plus expérimenté est celui de la thymidine kinase (TK) de l'herpès virus simplex de type 1 avec le gancyclovir (GCV) comme pro-drogue.

Deuxième partie : « Résultats actuels »

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les possibilités d'étude sur les virus en tant qu'armes thérapeutiques contre le cancer sont multiples. Cette partie regroupe les études à visée thérapeutique vétérinaire uniquement ; on n'y retrouve donc pas tous les virus précédemment cités, dont certains n'ont été étudiés qu'en médecine humaine.

On s'intéressera dans un premier temps à l'action oncolytique directe des virus puis à leur action indirecte par la stimulation du système immunitaire de l'hôte, le transfert de gènes suicides ou la potentialisation des thérapies anticancéreuses préexistantes.

I. Oncolyse virale directe

Les deux premières études présentées portent sur les tumeurs mammaires. Un quart des chiennes non stérilisées présentent des tumeurs mammaires à partir de quatre ans. Une moitié de ces tumeurs est de phénotype malin. Le traitement actuel est l'excision chirurgicale et la stérilisation de la chienne, pouvant éventuellement être couplé à de la radiothérapie. Cependant malgré l'intervention chirurgicale, 40 à 60% des chiennes atteintes meurent dans les deux premières années suivant la découverte de la tumeur (Gentschev et al, 2009).

A. Action oncolytique des protéines virales : l'Apoptine ou VP3 (Lee JJ et al, 2007)

1. Principe

Le virus de l'anémie du poulet ou CAV est connu pour interagir avec le processus d'apoptose des cellules. La capacité du CAV à induire l'apoptose est attribuée à une des protéines du virus, la VP3 ou Apoptine. Une étude récente portant sur ses mécanismes moléculaires a révélé qu'un certain nombre de protéines nouvelles interagissent avec la VP3 dans les cellules transformées (Lee JJ et al, 2007). Bien que les voies impliquant la VP3 dans la mort cellulaire ne soient pas encore élucidés, la caractéristique marquante de VP3 est sa capacité à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules saines. Cette remarquable capacité de sélection fait de la VP3 un candidat prometteur en tant qu'agent thérapeutique contre le cancer.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets antitumoraux associés à l'expression du gène VP3 dans les cellules de tumeurs mammaires canines (Canine Mammary Tumor, CMT),

dans le but d'en explorer le potentiel thérapeutique. Le gène codant pour la VP3 a été fusionné avec un autre codant pour une protéine fluorescente, l'EGFP, pour une détection en temps réel de l'expression du transgène.

Pour introduire le gène de l'Apoptine dans les cultures cellulaires de tumeur mammaire canine, des liposomes puis des lentivirus, pour améliorer encore l'expression du transgène, ont été utilisés. Les cellules CMT de cette étude sont directement extraites de tumeurs mammaires excisées chirurgicalement sur des animaux atteints de carcinomes mammaires. Une caractéristique importante de ces cellules est l'expression abondante d'une protéine anti-apoptotique. Cette caractéristique est présente dans la plupart des tissus mammaires tumoraux mais pas dans les cellules non néoplasiques, d'où l'intérêt de ces cellules dans une étude mettant en jeu une protéine apoptotique (Lee JJ et al, 2007).

2. Résultats

a. Liposomes

L'expression des vecteurs EGFP-VP3 et des témoins EGFP dans les CMT est d'abord confirmée par western blot avec utilisation d'anticorps polyclonaux anti-EGFP. Deux jours après transfection les protéines EGFP et EGFP-VP3 sont détectées à 30 et 40 kd, respectivement. L'examen par fluorescence de EGFP et EGFP-VP3 montre que, toujours 48h après l'infection, EGFP est réparti de façon égale dans le cytoplasme alors que EGFP-VP3 se localise de façon granulaire dans le noyau des cellules CMTs. Dans les cellules saines EGFP-VP3 et EGFP se localisent également dans le cytoplasme (Figure 18).

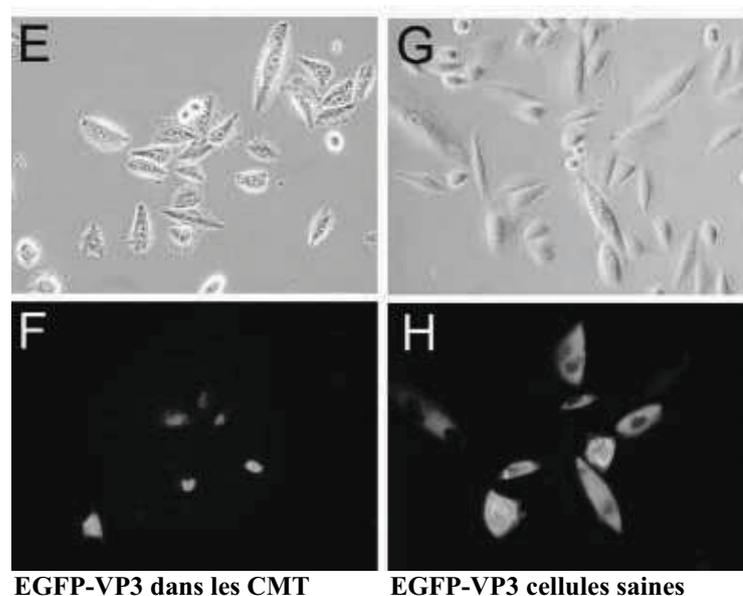


Figure 18. Fluorescence de EGFP-VP3 sur les cultures CMT (E et F) et cellules saines (G et H) (Lee JJ et al, 2007)

Alors que la durée d'expression augmente, l'examen microscopique révèle que les CMT exprimant EGFP-VP3 deviennent plus rondes et se détachent de la surface de la culture cellulaire. En comparaison, les cellules transfectées avec EGFP conservent leur apparence normale. Dans le groupe contrôle, une expression substantielle d'EGFP est détectée en western blot durant les quatre jours post infection. En revanche la quantité d'EGFP-VP3 décroît de façon significative sur la même période devenant quasi indétectable trois jours après l'infection et indétectable à quatre jours.

Pour écarter une éventuelle influence d'EGFP sur l'induction de la mort cellulaire, un transgène codant pour VP3 et un autre pour EGFP sont testés sur cultures de CMT. A 24, 48, et 72 heures après infection, les cellules sont observées sous microscope. Avec le temps, la proportion de mort cellulaire devient plus importante sur la culture exprimant la VP3 : $31 \pm 4\%$, contre $4 \pm 1\%$ pour la culture avec EGFP. De plus on observe sur les cellules avec VP3 une fragmentation et une condensation du noyau caractéristique de l'apoptose cellulaire (Lee JJ et al, 2007). Enfin la surexpression de l'Apoptine dans les CMT induit une augmentation de l'expression de la caspase 9.

b. Lentivirus

Des cellules CMT et des cellules mammaires canines non néoplasiques sont infectées par des lentivirus avec les transgènes pSIF-EGFP et pSIF-EGFP-VP3, puis observées 72 h après transduction. Les résultats indiquent que plus de 90% des CMT et environ 85% des cellules non néoplasiques expriment EGFP, de même pour EGFP-VP3. Cette dernière est associée à une localisation nucléaire dans les CMT et cause un arrondissement et un détachement important de ces cellules, alors que sur les non néoplasiques EGFP-VP3 reste localisée dans le cytoplasme et ne cause aucun dommage.

Plus de 70% des CMT sont tuées par apoptose après infection par le lentivirus codant pour EGFP-VP3, contre une dizaine de pourcent dans les cultures CMT contrôle avec EGFP. Sur les cellules non néoplasiques le taux de mort cellulaire est lui aussi significativement inférieur et aux alentours de 10% avec EGFP et EGFP-VP3. Ce taux de 70% est lui même beaucoup plus élevé que celui constaté avec le transfert d'EGFP-VP3 par les liposomes (30%).

3. Discussion

Les résultats de cette étude montrent que l'expression du gène de l'Apoptine dans les CMT induit une apoptose de ces cellules. En revanche, exprimée dans des cellules non néoplasiques, la VP3 ne provoque pas la mort cellulaire. La VP3 est exprimée dans le noyau des cellules tumorales sous forme de granulation. Cette localisation, non retrouvée dans les cellules saines, pourrait être responsable de la spécificité tumorale de VP3 (Lee JJ et al, 2007).

De plus, l'activité augmentée de la caspase-9 montrerait que l'apoptose induite par VP3 passerait par l'activité mitochondriale. En effet, dans le mécanisme suggéré par Teodoro et al (2004), la VP3 interfère avec la fonctionnalité du complexe anaphasique ce qui perturbe la mitose et active la voie apoptotique mitochondriale. Un récepteur nucléaire faciliterait la translocation de la VP3 du noyau aux mitochondries ce qui serait requis pour la toxicité de la protéine.

On notera également l'augmentation de l'efficacité du transfert avec l'utilisation des lentivirus par rapport aux liposomes.

Cette étude suggère que la protéine VP3 a un grand potentiel dans le développement de traitements antitumoraux en médecine vétérinaire du fait de la sélectivité de son effet toxique sur les cellules tumorales.

B. Oncolyse virale directe

1. Effets du virus de la vaccine sur des tumeurs mammaires canines (Gentshev I et al, 2009)

Toujours portée sur les tumeurs mammaires, une autre étude a été menée mettant en jeu non plus une protéine virale mais le cycle lytique même du virus.

a. Principe

La souche GLV-1h68 a été obtenue à partir de la souche LIVP du virus de la vaccine. Le virus est modifié par insertion de trois gènes marqueurs codant pour : la protéine fluorescente Renilla luciferase-green fusion (RUC-GFP), la β -galactosidase et la β -glucuronidase. Ces trois gènes servent de marqueurs à l'expression virale sans intervenir directement dans l'oncolyse virale (Zhang et al, 2007).

b. Protocole

L'activité lytique de GLV-1h68 a d'abord été testée in vitro, après infection d'une lignée cellulaire de CMT appelée ZMTH3 et d'une lignée témoin de fibroblastes de singe vert (CV-1).

Puis l'étude in vivo a été réalisée sur modèle murin. Cinq groupes de 5 à 6 souris âgées de huit semaines ont été greffée par 2.5×10^6 cellules tumorales ZMTH3 en sous cutané sur le membre postérieur droit. Au bout de 10 jours post-implantation, toutes les souris développent des tumeurs allant de 400 à 500mm³. Au jour 11 pour les groupes 1 et 4 ou 17 pour les groupes 2, 3 et 5, les souris ont reçu une injection de 5×10^6 ufp de GLV-1h68 dans la veine (IV) de la queue (groupe 1 et 2) ou dans le sinus veineux rétro-orbitaire (RO) sous anesthésie (groupe 3). Les souris du groupe 4 et 5 servant de témoins ne reçoivent qu'une solution saline, le groupe 4 en IV et le 5 en RO.

Tous les animaux sont suivis avec une mesure hebdomadaire du volume de la tumeur et certains par imagerie par fluorescence. La croissance tumorale est mesurée toutes les semaines et son volume est estimé selon la formule : $(\text{longueur} \times \text{largeur})^2 / 2$.

c. Résultats

- Cultures

Quatre jours après infection par le GLV-1h68, les cellules ZMTH3 et CV-1 sont fortement lysées, avec seulement 12 et 15% des cellules viables. La réplication de GLV-1h68 a été étudiée par titrage et expression de la GFP en microscopie fluorescente. La culture de ZMTH3 montre un pic d'expression de RUC-GFP à 72 et 96 h, CV-1 à 48 et 72 h.

- Modèle murin

Dans un premier temps, la capacité de GLV-1h68 à cibler le tissu tumoral implanté sur les modèles murins a été étudiée. Dans cette optique, 7 jours après l'injection du vecteur, deux souris de chaque groupe sont observées afin de détecter l'émission lumineuse de la RUC-GFP. L'expression de celle-ci est directement dépendante de la réplication du virus. De la luminescence est détectée dans la masse tumorale sur tous les animaux testés (Gentschev I et al, 2009).

De plus, 21 jours après l'injection, la fluorescence est observée sur les tumeurs en régression des souris traitées. La mesure des tumeurs montre que l'infection par le GLV-1h68 produit une forte inhibition de la croissance tumorale (Figure 19).

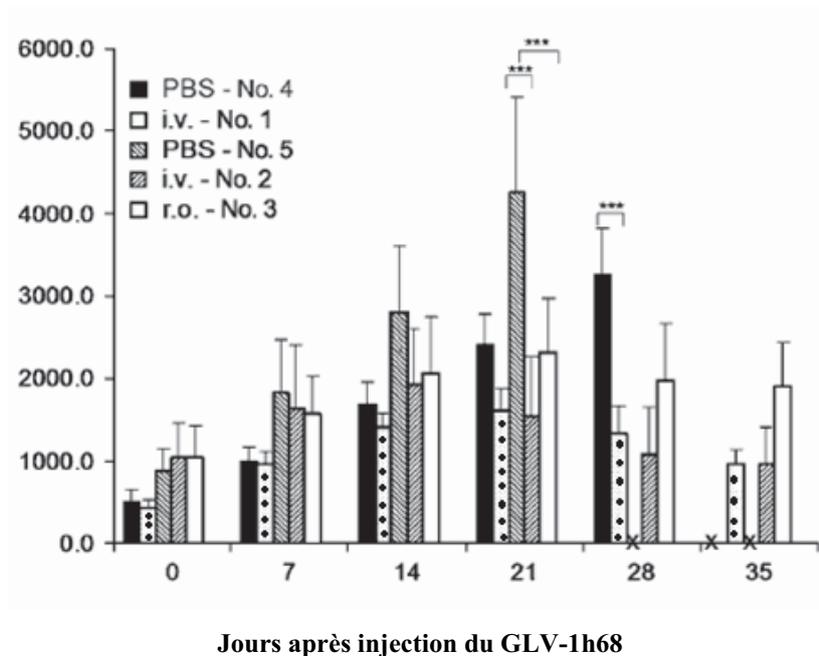


Figure 19. Evolution de la taille des tumeurs au cours des jours (GENTSCHEV I et al, 2009) Les croix représentent l'euthanasie des souris rendue nécessaire par la taille trop importante des tumeurs et sa répercussion sur l'animal. Les étoiles signalent les valeurs statistiquement différentes.

Après l'injection du virus, la croissance tumorale est arrêtée en trois semaines (groupes 1 et 3) alors que chez les groupes témoins (4 et 5) les tumeurs continuent de grossir. Dans tous les cas, le traitement viral conduit à une régression significative de la tumeur. De plus, 35 jours après l'injection une régression complète de la tumeur, définie par une réduction de la tumeur aux environs de 1000mm³ (taille initiale avant traitement), a été observée chez les animaux du groupe 2. Cependant la régression tumorale après une injection RO (groupe 3) n'est pas aussi rapide que celle observée dans les groupes 1 et 2 ayant reçu le virus en IV.

Chez les souris injectées en IV on retrouve des traces de virus dans les poumons et la rate, chez celles injectées en RO par contre on ne retrouve aucune trace du virus ailleurs que dans la tumeur. En revanche quelle que soit la voie employée, le tissu tumoral est complètement infecté par le virus, ce qui conduit à une oncolyse.

De façon générale la réponse anti tumorale est plus rapide et plus forte chez les souris injectées en IV : néanmoins cette différence de résultat pourrait être expliquée par la nécessité d'anesthésier les animaux au moment de l'injection en RO (Gentschev I et al, 2009).

Cette étude établit la capacité du virus recombiné GLV-1h68 à infecter et à se répliquer dans les cellules tumorales canines avec pour conséquence une lyse tumorale. Ces résultats soulignent le fort potentiel de GLV-1h68 en tant qu'arme thérapeutique contre les tumeurs mammaires chez le chien. Une étude in vivo sur des chiens reste à réaliser pour envisager l'utilisation thérapeutique d'un tel virus. Une étude menée sur le sérum d'une dizaine de chiens n'a détecté aucune présence d'anticorps dirigés contre GLV-1h68 (Gentschev I et al, 2009), mais d'autres paramètres pourraient jouer dans la biosécurité du virus.

2. Effet d'une infection par le virus de la maladie de Carré (CDV) sur les lymphomes

Le lymphome est l'hémopathie maligne du chien la plus fréquente, représentant 85 à 90% des hémopathies malignes et 10 à 20 % de l'ensemble des tumeurs canines.

Le terme *lymphome* (*lymphome malin* ou *lymphosarcome*) désigne les cancers solides des tissus lymphopœïétiques autres que la moelle osseuse tandis que le terme *leucémie* se réfère aux proliférations malignes primitives des différentes lignées de la moelle osseuse. Il existe différents types de lymphomes en fonction des tissus atteints : multicentrique, gastro-intestinal, médiastinal, cutané, ...

Le lymphome malin multicentrique, originaire des cellules lymphoïdes B, T ou NK (Natural Killer), est le plus rencontré chez le chien. La tumeur atteint en premier lieu les nœuds lymphatiques, puis le foie, la rate et enfin la moelle osseuse (Poujol, 2006).

En l'absence de traitement, le lymphome est généralement fatal en 4 à 6 semaines. Cependant le lymphome est une des tumeurs du chien qui répond le mieux à la chimiothérapie avec un taux de rémission clinique de plus de 75% et une durée médiane de survie de 6 à 11 mois. Ce taux chute à 40% lors d'une deuxième chimiothérapie et 20% si une troisième doit être envisagée.

Malgré l'efficacité de la chimiothérapie, l'écart entre les durées de survie est grand et certains chiens ont des durées de survie très courtes en dépit des thérapies agressives, d'où l'intérêt d'envisager d'autres formes thérapeutiques.

- a. Récepteurs CD150 et CD46 et tropisme viral (Sutter S.E et al, 2005)
 - Généralités

Les conséquences cliniques d'une infection par un Morbillivirus incluent une profonde immunosuppression avec une lymphopénie sévère. C'est cette dernière caractéristique qui a été prise en considération pour l'utilisation d'une souche atténuée du virus de la maladie de Carré (CDV) ou de la rougeole (MV) dans le traitement des lymphomes. Les souches sauvages de ces virus se lient aux cellules par le récepteur CD 150, tandis que certaines souches atténuées se lient au récepteur CD 46. Ces récepteurs cellulaires sont la clé du tropisme des Morbillivirus (Sutter S.E et al, 2005).

En prélude à un essai clinique de cette hypothèse, le but de cette étude est de déterminer si des cellules lymphoïdes canines saines et d'autres isolées à partir de chiens présentant un lymphome expriment CD150 et CD46 pour évaluer l'efficacité de l'infection par MV et CDV, et de déterminer si cette infection conduit à la mort cellulaire.

- Expression des récepteurs CD150 et CD46

En premier lieu, des lignées lymphocytaires canines (CLL-1390, CLGL-90 et 17-71), les lymphocytes périphériques d'un chien sain et de chiens atteints de lymphomes B et T, ont été examinés pour déterminer la présence ou non des récepteurs CD150 et CD46, ceci à l'aide d'un anticorps monoclonal utilisé en cytométrie humaine. Aucune des lignées cellulaires canines testées n'est positive pour l'un de ces deux récepteurs. Cependant, l'anticorps utilisé servant pour les récepteurs humains pourrait ne pas réagir en présence des récepteurs canins (Sutter S.E et al, 2005).

Ainsi après extraction de l'ARN des cellules, les ARNm du CD46 et CD150 ont été recherchés par RT-PCR. La transcription du CD150 a été détectée sur les trois lignées lymphocytaires testées (CLL-1390, CLGL-90, and 17-71), sur les lymphocytes périphériques prélevés sur un chien sain, et surtout sur ceux prélevés sur les nœuds lymphatiques de chiens atteints de lymphomes B et T. Le tropisme tissulaire du CDV, par la liaison au CD150 canin, est analogue à celui du virus de la rougeole chez l'homme ce qui explique la lymphopénie observée lors de l'infection au CDV et l'immunosuppression qui en découle. Contrairement à celle du CD150, la transcription du CD46 est observé uniquement sur les lymphocytes néoplasiques (Sutter S.E et al, 2005).

- Infection des cultures cellulaires par le CDV et conséquences

La capacité in vitro de ces cellules à être infectées par le CDV a ensuite été étudiée. Les cellules de la lignée lymphocytaire canine 17-71 et CLGL-90 sont infectées de façon très efficace, à 93% et 60% respectivement. Plus important, les lymphocytes néoplasiques prélevés sur des animaux atteints sont également capables d'être infectés, avec 47% pour les B et 90% pour les T. La répétition de ces expériences montre que le CDV infecte de façon constante ces cellules lymphocytaires néoplasiques (Sutter S.E et al, 2005).

Cette infection *in vitro* des lignées CLGL-90 et 17-71 conduit à une apoptose cellulaire. Bien que l'infection par CDV des lymphocytes néoplasiques provenant de patients canins soit avérée, les conditions de culture de ces cellules sont méconnues et ne permettent pas d'attribuer l'apoptose observée au virus (Sutter S.E et al, 2005).

L'expérience présentée montre que le CDV peut infecter les lignées cellulaires hématologiques et lymphocytaires néoplasiques isolées sur des animaux atteints de lymphomes B et T. De plus l'infection semble bien conduire à une lyse des cellules infectées. Ceci permet de poser les bases pour des études additionnelles *in vivo* sur l'utilisation du CDV en tant qu'arme thérapeutique pour les lymphomes canins (Sutter S.E et al, 2005).

De plus, des vaccins à base de souches atténuées de CDV sont utilisés par millions de doses à travers le monde depuis près de 40 ans avec une très bonne sécurité d'utilisation. La disponibilité et l'accessibilité de ce virus oncolytique ainsi que les ressemblances entre les lymphomes canins et humains offrent une opportunité unique de développer des traitements alternatifs pour chacune de ces maladies.

b. Etude d'un possible mécanisme d'action du CDV sur les lymphomes (Puff et al, 2009)

- Principe

Une infection par un *Morbillivirus* est connue pour avoir des effets oncolytiques *in vitro* mais le mécanisme de cette action reste méconnu. Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) ont un statut d'oncogènes (Lacave R et al, 2005). Ce sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les composés protéiques de la matrice.

L'importance des MMP dans les processus cancéreux a été mis en valeur par des études sur l'animal de laboratoire : des cellules de tumeur relativement bénignes transplantées chez des souris acquièrent un phénotype beaucoup plus malin si elles surexpriment une MMP. A l'inverse, les tumeurs sont beaucoup plus bénignes si l'expression des MMP est diminuée.

Dans les tumeurs humaines, il a été montré que l'expression de MMP est quasi systématiquement accrue dans presque tous les types de tumeurs (Lacave R et al, 2005). Cette expression est corrélée avec un stade avancé de la tumeur et la présence de métastases. Les MMP participent à la croissance cellulaire en induisant des signaux prolifératifs, elles régulent l'apoptose, l'angiogenèse et permettent la dissémination de cellules tumorales en

catalysant la destruction de la membrane basale. Compte tenu de leurs effets multiples, les MMP comptent parmi les cibles de premier choix à inhiber.

La glycoprotéine de membrane RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) et les TIMP (Tissus Inhibiteurs de MétalloProtéases) inhibent les métalloprotéases de matrice (MMP). La RECK notamment est très présente dans les tissus sains alors que dans les tissus cancéreux elle se fait plus rare (Lacave R et al, 2005).

Le CDV infecte une variété de cellules, incluant les macrophages/monocytes, lymphocytes tumoraux et microglie, in vivo, ce qui résulte en différents mode d'expression de MMP et TIMP. Cette étude a eu pour objet d'observer l'influence d'une infection persistante par le CDV sur l'expression des MMP-2, -9, -13, -14, TIMP-1, -2 et du gène suppresseur de tumeur RECK dans les lignées cellulaires de macrophages/monocytes tumoraux DH82.

- Effets de l'infection par le CDV sur les différentes protéines

L'expression des MMP et TIMP est déterminée par RTqPCR sur des lignées cellulaires de macrophages/monocytes tumoraux DH82 non infectées et infectées de façon persistante par le CDV. L'immunofluorescence à l'aide d'un anticorps polyclonal reconnaissant le CDV démontre une positivité des cultures infectées de 85 à 95%.

On observe sur les deux cultures (infectées ou non par CDV) l'expression de différentes protéines telles que les MMPs, TIMPs, et RECK. Certains gènes sont inhibés (MMP-2, TIMP-1, TIMP-2), d'autres activés (MMP-13, MMP-14, RECK) et d'autres encore ne changent pas de façon significative (MMP-9) (Puff et al, 2009).

○ MMP-2

La transcription de MMP-2 est grandement diminuée dans les cellules infectées, or de plus forts taux de cette protéine ont été retrouvés dans le plasma de chiens atteints de lymphomes par rapport à des chiens sains (Puff et al, 2009). De ce fait, on peut spéculer que la réduction de l'expression de MMP-2 sur les cellules DH82 infectées pourrait conduire à diminuer le pouvoir invasif et métastatique de ces cellules. Ce fait reste à vérifier expérimentalement.

○ TIMP-1 et 2

TIMP-1 et 2 sont elles aussi inhibées sur les cellules infectées. L'influence de ces deux protéines sur l'expression maligne de la tumeur reste controversée.

Un taux d'expression élevé de TIMP-1 a été associé à une suppression du pouvoir métastatique des mélanomes et pour TIMP-2, l'augmentation de son expression chez les hommes atteints de carcinomes mammaires est directement corrélée à une augmentation de l'espérance de survie (Puff et al, 2009).

Cependant des études suggèrent que l'expression augmentée des TIMPs est concordante avec une augmentation de la malignité du lymphome (Puff et al, 2009). De forts taux de TIMP-2 ont été détectés dans les cellules néoplasiques de lymphocytes T alors que ce taux restait faible dans les lymphocytes périphériques normaux. Ces observations suggèrent que TIMP-1 et TIMP-2 ont une activité semblable à des facteurs de croissances en plus de leur fonction inhibitrice des MMPs. Une interaction virale directe via un récepteur de surface inconnu pourrait contribuer à cette activité de facteur de croissance de ces protéines. L'influence d'une chute du taux de TIMP-1 et TIMP-2 dans les cellules DH82 infectées reste à déterminer et pourrait indiquer une réduction de l'activité de facteur de croissance viro-induite.

Du fait de leurs multiples fonctions il ne peut pas être écarté que la chute du taux d'expression constatée sur les cellules DH82 infectées puisse favoriser la malignité du cancer (Puff et al, 2009).

○ MMP-13 et 14

L'expression de MMP-13 et MMP-14 est augmentée dans les cellules DH82 infectées. L'augmentation de MMP-13 est liée à une augmentation du pouvoir métastatique des néoplasmes. Une récente étude montre une corrélation similaire entre l'expression de MMP-14 et le comportement tumoral. Ces MMPs agiraient en tant que partie d'une cascade protéolytique qui aboutirait à une activité collagénasique extracellulaire augmentant les possibilités d'invasion du tissu et de métastase de la tumeur. La relevance de l'augmentation de l'expression de MMP-13 et MMP-14 n'a pas été déterminée dans cette étude (Puff et al, 2009).

- RECK

Le taux de protéine RECK est augmenté dans les cellules DH82 infectées. Takahashi et al. (1998) ont démontré que la restauration de l'expression de RECK dans les lignées de cellules tumorales provoque une réduction de la capacité invasive et métastatique dans des études in vitro et in vivo. Plusieurs études ont montré que le taux d'expression de RECK pouvait être utilisé comme marqueur pronostique sur les néoplasmes humains. Les néoplasmes canins montrent également une réduction de l'expression de RECK dans différents types de cellules tumorales à la fois in vitro et in vivo mais sans corrélation entre l'expression de RECK et des découvertes clinico-pathologiques.

- Conclusion

Après l'infection par le CDV, les taux de MMP-2, TIMP-1 et TIMP-2 ont été réduits, pendant que ceux de RECK et MMP13 et 14 étaient augmentés. Ces résultats suggèrent que l'infection rétablit l'expression de RECK dans les cellules tumorales interférant ainsi avec les taux d'expression des MMPs et TIMPs. Ceci pourrait influencer sur le phénotype malin de la tumeur au bénéfice de l'hôte. Ceci reste néanmoins à vérifier par des études in vivo.

C. Oncolyse virale par virus recombiné ciblant la tumeur : Ostéosarcomes (Smith BF et al 2006)

Si certains virus ciblent naturellement les tissus tumoraux d'autres doivent être recombinés pour cibler leur action lytique sur les cellules cancéreuses.

Les ostéosarcomes représentent 5% des tumeurs canines et sont les tumeurs malignes les plus fréquentes chez les grands chiens. Elles sont très agressives et on considère que plus de 90% ont déjà micro-métastasé à l'heure du diagnostic. Les chirurgies lourdes (amputation) et la chimiothérapie ne permettent de gagner que 6 à 8 mois de survie maximum, d'où l'intérêt de développer un nouveau traitement. Des études sont en cours, fondées sur l'utilisation d'un CRADs canin.

1. Conception du virus

On a pris pour base l'adénovirus canin de type 2 (CAV 2) originellement responsable de la toux de chenil chez les chiens. Le CAV 2 a été ciblé plus spécifiquement sur les cellules d'ostéosarcomes par le placement des gènes de la région E1A, essentiels à la réplication (cf. 1ère partie II.B.1.), sous le contrôle d'un promoteur murin ostéocalcine (OC). Le virus ainsi créé, appelé OC-CAVE1, ne pourrait donc se répliquer que dans les cellules exprimant l'ostéocalcine (Smith BF et al 2006).



Figure 20. Représentation schématique d'OC-CAVE1 (Smith BF et al 2006)

Ce promoteur a été choisi car l'OC est peu exprimée dans les cellules osseuses saines mais très active dans les cellules d'ostéosarcomes. Une fois le virus conçu et réfléchi à partir de connaissances théoriques, il faut tester sa capacité à infecter, se répliquer et causer la lyse des cellules cancéreuses mais aussi sa sélectivité vis-à-vis de ces cellules.

2. Test d'efficacité

a. In vitro

Le virus est d'abord testé sur des lignées cellulaires canines in vitro parmi lesquelles des cellules saines de différents types (rénales, fibroblastes, épithéliales,...) et des cellules d'ostéosarcomes. La souche sauvage du virus (CAV 2) sert de témoin lytique positif. On a ainsi constaté une absence de cytotoxicité d'OC-CAVE1 sur les cellules saines. En revanche, les cellules cancéreuses d'ostéosarcomes sont bien lysées (Smith BF et al 2006).

b. In vivo sur modèle murin

Des cellules d'ostéosarcomes canins ont été implantées sur des souris immunodéficientes. La tumeur se développe ainsi en sous cutané. Différents modèles murins ont été étudiés afin de prendre celui pour lequel le développement de la tumeur correspond le plus à l'évolution naturelle sur les chiens. Lorsque la masse atteint un diamètre de 5 mm, une injection intra-tumorale est réalisée.

On a, comme précédemment, un lot témoin positif avec l'utilisation de CAV2 et un lot témoin négatif avec injection uniquement du diluant stérile utilisé pour injecter les virus. Deux protocoles différents sont testés :

- trois injections de 10^9 particules virales
- une injection simple de 10^8 particules

Lors des trois injections répétées l'efficacité est plus marquée avec la souche sauvage qu'avec OC-CAVE1, les deux ayant un effet de lyse tumorale nettement supérieur au lot traité avec le diluant. En revanche avec une seule administration virale, c'est OC-CAVE1 qui est le plus efficace, loin devant CAV2, lui-même loin devant le lot témoin. Aucune toxicité n'est constatée sur les souris (Smith BF et al 2006).

En résumé, on a une bonne efficacité d'OC-CAVE1 associée à un bon ciblage cellulaire in vitro et sur modèle murin. On peut noter la meilleure efficacité à plus faible dose de OC-CAVE1 par rapport au virus sauvage, cela étant sûrement imputable à la régulation de E1A par le promoteur OC qui pourrait augmenter l'efficacité de la réplication dans les cellules tumorales riches en OC (Smith BF et al 2006).

Après avoir créé un virus et démontré son efficacité sur des modèles différents il faut s'assurer de l'innocuité du virus chez les chiens, futurs patients.

3. Innocuité

Afin de vérifier l'absence de toxicité du virus, on commence par le tester en l'injectant à des chiens sains. Six chiens, répartis en deux groupes de trois, ont été spécialement élevés dans le cadre de cette étude. Les chiens sont âgés de 2 à 3 ans et ont été vaccinés annuellement (CHPPiL). On donne de la cyclophosphamide à un des groupes durant 6 jours, commençant 3 jours avant l'injection pour induire une immunosuppression.

L'injection de 2×10^{12} particules virales diluées dans 5 ml de solution saline est réalisée en intraveineuse dans la veine céphalique. Elle est effectuée sous monitoring en cas de toxicité aigüe et différents paramètres (état général, hémogramme, PCR OC-CAVE1 sanguine, fécale et urinaire) sont observés quotidiennement après l'injection. Au bout de 4 jours les chiens sont euthanasiés et autopsiés avec prélèvement d'organes (reins, foie, rate...).

Au terme de l'expérience on ne constate aucune toxicité immédiate. Sur les 4 jours d'observation, l'examen clinique général quotidien est normal chez tous les chiens mis à part un petit épisode de diarrhée vite résolu chez un des chiens. En revanche on observe une neutropénie légère sur deux des chiens et une vraiment marquée chez un troisième. Les PCR révèlent de l'ADN viral circulant jusqu'à l'euthanasie au bout de 4 jours ; on en retrouve aussi dans les fèces et l'urine mais en très faible quantité (Smith BF et al 2006).

A l'autopsie on retrouve de l'ADN viral dans la rate sur trois chiens et dans le foie sur deux chiens. Il n'y a pas de différence notable entre les deux groupes immunosupprimés ou non (Smith BF et al 2006).

Ce test de sécurité est donc encourageant avec cependant une réserve suite à la forte neutropénie exprimée par un des chiens et le faible échantillonnage. La prochaine étape consiste en une étude à long terme pour laquelle suite aux résultats de l'autopsie on surveillera particulièrement le foie et la rate, on pourra aussi approfondir d'éventuelles différences au niveau de l'efficacité de l'immunosuppression. Ceci a pour objectif d'aboutir à des essais cliniques sur des animaux atteints.

II. Stimulation et orientation de la réponse immunitaire de l'hôte

A. Mélanome : 2 cas cliniques (Von Euler et al, 2008)

Les mélanomes sont des tumeurs fréquemment rencontrées en médecine vétérinaire, elles représentent 3% des néoplasmes canins et jusqu'à 7% des tumeurs malignes. Ces tumeurs sont en général bénignes chez les chiens excepté à certaines localisations : interdigitée, jonctions cutanéomuqueuses, cavité orale. A ces endroits les mélanomes sont généralement très agressifs et métastasent rapidement aux nœuds lymphatiques périphériques et aux poumons.

Dans ces cas une exérèse chirurgicale large est nécessaire et peut donner de bons résultats ; cependant la chirurgie n'est pas toujours réalisable selon la localisation de la tumeur. Les taux de survies sont très restreints et les mélanomes malins résistent aux traitements habituels tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie. La plupart des chiens sont euthanasiés suite aux complications liées aux métastases. Aux stades avancés de la maladie la médiane de survie est inférieure à 5 mois après exérèse chirurgicale.

1. Principe du virus utilisé

Les mélanomes canins et humains se ressemblent beaucoup de par leur évolution. De nombreuses études sur une approche thérapeutique virale ont été menées pour la médecine humaine. Elles ont conduit à la formation d'un virus appelé AdCD40L. AdCD40L est un adénovirus humain avec une délétion de la région E1 et un ajout de matériel génétique codant pour la transcription de CD40L dans la cellule hôte. CD40L est un ligand de CD40 et a un fort pouvoir immunogène (Van Kooten C et al 1997).

En temps normal l'interaction entre la molécule CD40, exprimée par les cellules dendritiques (DC), et le ligand, exprimé par les lymphocytes T CD4+, contribue à l'induction d'une immunité anti-tumorale protectrice. En effet, cette interaction joue un rôle crucial dans l'initiation et l'activation des cellules T CD8+, en favorisant l'activation des LT CD4+ d'une part, mais aussi celle des DC d'autre part. Ces dernières deviennent compétentes pour initier à leur tour l'activation des cellules T CD8+ (Van Kooten C et al 1997). Enfin, la production de CD40L par des mécanismes encore peu connus a une action apoptotique directe sur les cellules cancéreuses.

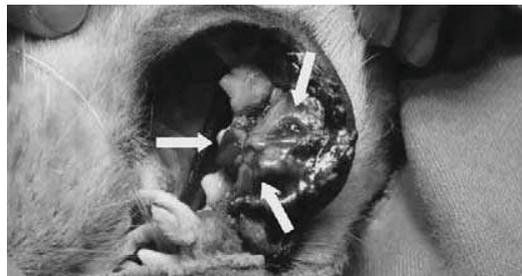
C'est donc sur la combinaison de ces deux effets de stimulation du système immunitaire de l'hôte et de l'effet apoptotique direct, qu'est fondée la thérapie génique par le gène codant pour CD40L.

Du fait des résultats probants obtenus en médecine humaine, ce virus a été directement testé sur les deux cas cliniques présentés ci-dessous.

2. Cas clinique n°1

a. Commémoratifs

Une chienne Labrador non-stérilisée de 9 ans est présentée avec une tumeur de la cavité orale ayant été traitée localement deux mois plus tôt par diathermie. La masse est réapparue une semaine avant la consultation et augmente rapidement (Fig. 21).



**Figure 21. Mélanome récidivant après diathermie avant la thérapie génique
(Von Euler et al, 2008)**

La chienne présente, depuis une semaine également, des saignements buccaux, une apathie et une dyspnée hyperventilatoire. La tumeur fait 4,5cm de diamètre, et le nœud lymphatique mandibulaire ipsilatéral est hypertrophié. L'examen radiographique du thorax montre une image radio-opaque circulaire de densité tissulaire d'environ 8mm de diamètre dans le médiastin cranial du poumon gauche (Von Euler et al, 2008).

A l'analyse histopathologique, on observe quelques mélanocytes bien différenciés mais la plupart des cellules sont peu différenciées et les figures mitotiques et atypiques sont nombreuses. Le mélanome a donc un haut degré de malignité, ajouté à l'observation radiologique d'images compatibles avec des métastases pulmonaires le pronostic est très sombre (Von Euler et al, 2008).

Le propriétaire a décliné la mandibulectomie partielle du fait de la présence de métastase pulmonaire. A la place le propriétaire a opté pour l'essai de la thérapie génique avec AdCD40L suivie d'une chirurgie réductrice.

b. Protocole

Deux traitements ont été réalisés à 4 jours d'intervalles. Le traitement consiste en l'injection en sous cutané et en différents points, intra et péri-tumoraux (Fig. 22), de 9.6×10^8 particules virales diluées dans 1,5 ml de solution saline. Les injections sont réalisées sous sédation avec 0.01 mg/kg de médétomidine (Domitor ND) et 0.1 mg/kg de butorphanol (Torbugesic ND).



Figure 22. Injection intra-tumorale sous sédation (Von Euler et al, 2008)

Une semaine après le dernier traitement une chirurgie réductrice sans recherche d'une exérèse totale est effectuée et la masse retirée est conservée pour analyse histopathologique.

c. Résultats

Suite au traitement, la chienne n'a montré aucune anomalie de l'état général durant les deux semaines suivant la thérapie génique. La tumeur a grossi d'environ 20% avant la réduction chirurgicale. Cependant, la masse tumorale est devenue plus organisée, plus pâle, et les saignements buccaux ont disparus 3 jours après la première injection d'AdCD40L (Fig. 23).



Figure 23. Mélanome 14 jours après début de la thérapie génique et avant réduction chirurgicale (Von Euler et al, 2008)

En postopératoire la chienne a présenté quelques jours de dysorexie consécutif à la chirurgie plastique nécessaire à la reconstruction de la lèvre inférieure qui a temporairement réduit l'amplitude de l'ouverture buccale (Fig. 24).



**Figure 24. Réduction chirurgicale et plastie de la lèvre inférieure
(Von Euler et al, 2008)**

A l'analyse histopathologique post chirurgicale, c'est-à-dire sept jours après la deuxième injection, on a noté une augmentation du nombre de lymphocytes B et la tumeur était infiltrée par un grand nombre de lymphocytes T CD3+. On avait donc bien une réaction inflammatoire marquée, consécutivement aux injections.

Aucune récurrence de la tumeur ou hypertrophie de nœuds lymphatiques n'ont été détectées durant les 401 jours suivant la thérapie génique. La chienne est décédée au bout de 401 jours des suites d'un adénocarcinome mammaire. À l'autopsie aucune trace de mélanome n'a été détectée ni macroscopiquement ni microscopiquement. Des métastases ont été trouvées dans les poumons mais l'analyse histopathologique a montré qu'elles étaient uniquement des métastases de l'adénocarcinome mammaire (Von Euler et al, 2008).

3. Cas clinique n°2

a. Commémoratifs

Un Jack Russell terrier, âgé de 16 ans, est présenté pour récurrence d'une tumeur oculaire sur la conjonctive. La tumeur avait été traitée chirurgicalement et analysée 6 mois auparavant. L'analyse histopathologique avait révélé un mélanome de haut grade de malignité avec de nombreuses figures mitotiques dont des atypiques, ainsi qu'une exérèse chirurgicale incomplète. La masse est réapparue 4 semaines avant la consultation et a doublé durant la dernière semaine (Fig. 25).



**Figure 25. Mélanome récidivant après exérèse chirurgicale et avant la thérapie génique
(Von Euler, Sadeghi, Carlsson, et al, 2008)**

On observe unilatéralement du côté de la masse, depuis 3 semaines : un épiphora, une conjonctivite purulente et une uvéite. A l'examen on note une masse conjonctivale de 12x8mm sur la paupière inférieure gauche. On ne relève aucune autre anomalie de l'état général, pas d'hypertrophie des nœuds lymphatiques périphériques ni de signes de métastases (Von Euler et al, 2008). Etant donné la localisation de la tumeur, sa taille, son évolution rapide et les résultats de l'analyse histopathologique, le pronostic était sombre. Le propriétaire a décliné la solution de l'énucléation, dans le cadre d'une chirurgie invasive nécessaire à l'obtention de marges saines, et a préféré essayer la thérapie génique.

b. Protocole

Six traitements ont été réalisés à 7 jours d'intervalles pour les cinq premiers et 14 jours entre le cinquième et le sixième traitement. Les doses utilisées et le mode opératoire sont semblables à ceux utilisés pour le cas n°1 à une différence près : l'administration supplémentaire d'un anesthésique local, de la tétracaïne 1% (Tetrakain Chauvin ND) 10 minutes avant chaque traitement.

c. Résultats

La thérapie génique provoque d'abord une réaction inflammatoire qui fait grossir la tumeur mais rapidement elle commence à décroître (Von Euler et al, 2008). Après la seconde injection d'AdCD40L elle mesure 9x6mm et les signes cliniques d'irritation dus à la tumeur ont disparu (Fig. 26).



Figure 26. Aspect après deux injections (Von Euler, Sadeghi, Carlsson, et al, 2008)

Au quatrième traitement le mélanome n'est plus visible qu'en rabattant la paupière inférieure. À la sixième injection, la tumeur est quasiment en complète rémission et mesure 5x2mm : l'œil a maintenant une apparence normale (Fig.27).



Figure 27. Aspect après six injections (Von Euler, Sadeghi, Carlsson, et al, 2008)

On note cependant une alopecie locale le long de la paupière inférieure. Les poils repousseront 3 semaines après la dernière injection (Von Euler et al, 2008).

Au niveau de l'état général l'animal a présenté de la fièvre, une neutrophilie modérée et une baisse d'appétit 4 jours après la seconde injection. Ces symptômes sont rentrés dans l'ordre en 2 jours et, durant le reste du traitement, l'état général était normal.

On a réalisé une électrophorèse avant chaque traitement ce qui a permis de mettre en évidence pendant les 4 premiers traitements un pic d' $\alpha 1$ globulines. On a également constaté pendant les deux premiers traitements une leucocytose modérée. L'injection d'AdCD40L a donc déclenché une réaction inflammatoire systémique détectable à partir du 7^e jour de la thérapie et jusqu'à la quatrième injection.

Cent cinquante jours après le début de la thérapie génique à AdCD40L, le chien était en rémission partielle et 90 jours après la dernière injection, on n'a noté aucun signe de progression de la tumeur ou de métastase (Von Euler et al, 2008).

4. Conclusion

De façon générale sur ces deux cas la quasi absence de toxicité, la facilité d'administration et surtout les réponses observées au traitement avec des rémissions importantes sur des tumeurs pourtant considérées comme très agressives, encouragent la poursuite d'essais cliniques avec AdCD40L sur les mélanomes canins.

Cependant, à cause de la forte potentialité immunogène de CD40L, on peut craindre des effets secondaires de type réaction auto-immune. Cela est d'ailleurs constaté dans le deuxième cas avec une alopécie transitoire (Von Euler et al, 2008).

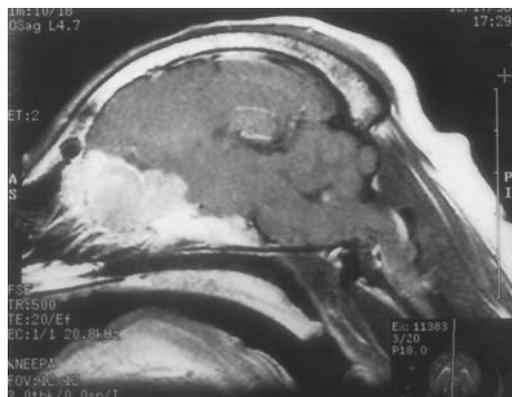
III. Thérapie par gène-suicide sur les tumeurs cérébrales : GCV/TK

A. Cibler la tumeur : étude de l'expression d'un transgène sur un méningiome canin in vivo (Chauvet AE et al, 1998)

Les méningiomes sont les plus représentés des néoplasmes cérébraux, environ 20%, et sont généralement guéris après une exérèse totale de la tumeur (Chauvet AE et al, 1998). Cependant, quelques méningiomes sont inaccessibles chirurgicalement et la radiothérapie ne peut alors que retarder leur croissance. Il n'existe pas de chimiothérapie contre les méningiomes qui résisteraient à l'opération et à l'irradiation. De plus, les méningiomes sont des tumeurs compactes avec de nombreuses jonctions GAP ce qui pourrait les rendre plus sensibles à la thérapie génique notamment à l'association HSV1-TK/GCV du fait de l'effet « by-stander » (cf Partie 1, III, C,3.).

1. Présentation du sujet

Une femelle West Highland White Terrier de 14 ans et 8kg est présentée à la consultation pour crises convulsives. Un diagnostic de méningiome olfactif est réalisé à l'aide d'imagerie à résonance magnétique (IRM) (Fig. 28). Après qu'un artériogramme cérébral ait démontré une abondante vascularisation de la tumeur par les artères carotides internes et externes, le chien est sélectionné pour l'injection et le consentement des propriétaires est acquis.



**Figure 28. IRM de la tête du chien révélant une masse frontale compatible avec un méningiome
(Chauvet AE et al, 1998)**

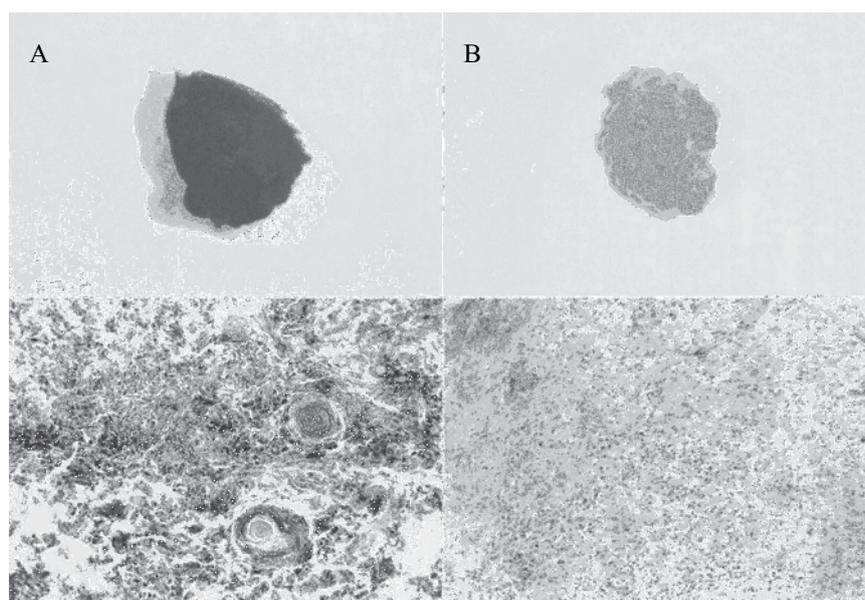
2. Protocole

Le vecteur utilisé est appelé AdLacZ. C'est un CRAAds délété en région E1A et B avec introduction du gène *LacZ*. Ce gène code pour une β -galactosidase (β -gal), cette enzyme a pour caractéristique de réagir avec le X-gal pour donner une réaction colorimétrique qui permet d'évaluer l'activité de β -gal et donc le degré d'expression du transgène dans la cellule (Chauvet AE et al, 1998). Le gène est placé sous le contrôle d'un promoteur CMV. L'injection de $2,3 \cdot 10^9$ ufp (unité formant plaque) dans 1mL de solution saline est réalisée en intra-artériel dans la carotide interne et dans la branche maxillaire de l'artère carotide externe gauches, ceci à l'aide d'un cathéter pour être au plus proche de la tumeur.

Le chien est ensuite maintenu en isolement 5 jours puis une craniotomie est réalisée pour la résection de la tumeur. Les tissus tumoraux et péri-tumoraux sont prélevés pour analyse histopathologique et colorimétrie X-gal. Des prises de sang sont réalisées avant et après l'opération. Après une période de convalescence de 5 jours, le chien retourne chez ses propriétaires.

3. Résultats

L'analyse histopathologique montre une tumeur avec un aspect typique de méningiome. De plus, la figure ci dessous montre clairement une coloration bleue du tissu tumoral et donc une bonne expression du transgène, en revanche, le tissu péri tumoral prélevé montre peu de transduction (Chauvet AE et al, 1998).



**Figure 29. A. Aspect macro et microscopique du tissu tumoral
B. Aspect macro et microscopique du tissu péri-tumoral (Chauvet AE et al, 1998)**

Cette étude démontre la réussite de l'expression du vecteur transgénique dans un méningiome canin in vivo.

4. Toxicité

La seule toxicité constatée durant l'étude est une légère raideur du membre postérieur droit pendant 2 jours à la suite de l'injection. Cette raideur s'est résolue d'elle même. Les analyses sanguines et biochimiques varient peu et restent dans les valeurs usuelles à l'exception de la phosphatase alcaline (PAL) légèrement élevée avant et après l'opération. Les examens neurologiques sont restés normaux après la chirurgie et aucune thérapie anticonvulsive n'a été nécessaire. Deux mois après l'opération le chien n'a pas présenté de convulsions (Chauvet AE et al, 1998).

Bien que dans l'incapacité d'examiner l'éventuelle dissémination du vecteur au sein de l'organisme de l'animal, aucune toxicité neurologique ou systémique n'a été observée durant les deux mois suivant l'opération. Cette étude confirme une bonne expression du transgène dans le tissu tumoral cérébral. Des études avec notamment un transgène thérapeutique et permettant d'observer une éventuelle dissémination dans l'organisme, sont à envisager pour pouvoir se prononcer sur une efficacité thérapeutique et sur les éventuels effets secondaires liés à l'expression d'un autre transgène que *LacZ*.

B. TK/ GCV sur les gliomes (Candolfi M et al, 2007)

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs cérébrales très agressives et invasives localement pour lesquelles on ne dispose d'aucun traitement. Elles représentent 12% des tumeurs cérébrales. Ce sont des tumeurs relativement courantes notamment chez les races brachycéphales comme les Boston Terriers ou les Boxers, prédisposés à ce type d'atteintes. La durée de survie après diagnostic ne dépasse pas les 6-12 mois (Candolfi M et al, 2007).

1. Principe

Trois types de transgènes sont évalués in vitro. Le premier est un simple marqueur de la transduction déjà présenté auparavant : *lacZ*. Le second est le gène codant pour la Thymidine Kinase de l'Herpès Simplex Virus 1 (TK-HSV1). Le troisième code pour le ligand de la Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3L). Ces deux derniers sont à visée thérapeutique selon le mode d'action décrit ci-dessous (Candolfi M et al, 2007).

Les trois vecteurs sont construits à partir de CRAds avec l'un des trois gènes introduit sous contrôle d'un promoteur CMV murin (mCMV) ou humain (hCMV).

a. HSV1-TK

La thymidine kinase (TK), issue de l'herpès virus de type 1 (HSV1-TK), permet la phosphorylation d'un certain nombre d'analogues nucléosidiques dont un analogue de la guanosine : le ganciclovir (GCV). Cette molécule est en fait un agent anti-herpétique utilisé lors du traitement des infections au cytomégalovirus. Les TK endogènes des cellules eucaryotes ont une faible affinité pour le GCV. De ce fait, il est très peu phosphorylé en temps normal. Lorsque le gène HSV1-TK est transféré dans des cellules cancéreuses, la TK herpétique provoque la phosphorylation du GCV en GCV monophosphate. Sous cette forme, le GCV est à nouveau phosphorylé par les TK endogènes en GCV biphosphate puis triphosphate. La forme GCV triphosphate est alors utilisée par la cellule pour la synthèse d'ADN à la place de désoxyguanosine triphosphate. Ceci inhibe la progression de l'ADN polymérase et donc l'élongation du brin d'ADN, ce qui provoque la mort de la cellule.

Une des caractéristiques majeures de ce système est la présence d'un effet dit « bystander » qui permet la destruction des cellules cancéreuses non transfectées par le gène

HSV1-TK, mais se trouvant dans le voisinage de cellules qui le sont. Deux voies sont possibles pour expliquer ce phénomène : le GCV sous sa forme monophosphate pourrait passer d'une cellule à l'autre via les jonctions intercellulaires (jonctions GAP ou connexines), ou il peut y avoir libération de vésicules apoptotiques par les cellules transfectées lors du traitement au GCV avec mise en place in vivo d'une réponse immunitaire.

b. Flt3L

Flt3L est une molécule immunogène qui augmente de manière importante le nombre de cellules dendritiques et de cellules NK (Natural Killers). Le but recherché est de combiner l'action lytique du transgène précédemment décrit, qui va libérer des antigènes tumoraux, à l'effet immunostimulateur de Flt3L (Candolfi M et al, 2007).

c. HC-Ads

En présence d'une préexposition aux adénovirus, la réponse immunitaire peut éliminer l'expression des transgènes issus des premières générations d'Ads. Elle pourrait également déclencher une réponse immune ou inflammatoire neurotoxique. Une étude réalisée sur 17 chiens à partir de prélèvements sanguins montre que 60% des chiens présentent des anticorps anti adénovirus (Candolfi M et al, 2007). Suite à cette étude il s'avère nécessaire d'utiliser plutôt des vecteurs de type HC-Ads (High Capacity – Adenovirus) pour la thérapie génique des gliomes canins.

Les HC-Ads expriment leurs transgènes sous le contrôle de promoteurs hCMV ou mCMV avec un génome viral complètement démuné de toute séquence adénovirale d'origine. Les HC-Ads peuvent être munis d'un système de régulation d'expression TetON. Ce système permet d'activer l'expression du transgène en présence de doxycycline (DOX).

2. Tests d'expression et de bio efficacité

a. In vitro

- CRAds et promoteur hCMV

Pour déterminer la faisabilité d'un vecteur thérapeutique les premiers tests ont été réalisés in vitro sur des cellules de gliomes canins. Comme le montre la figure, on détecte, par immunofluorescence, une transduction du transgène quel qu'il soit. L'efficacité de transduction atteint pour les 3 vecteurs un peu plus de 40% (Candolfi M et al, 2007).

L'activité biologique des transgènes est elle aussi évaluée. L'activité de la β -galactosidase est bien détectée dans les cellules infectées (graphique Fig. 30A). De même dans les cultures cellulaires infectées avec HSV1-TK la viabilité des cellules chute à 50% (graphique Fig. 30B) en présence de GCV qui révèle l'effet cytotoxique du transgène. Le Flt3L doit lui être sécrété par les cellules transfectées, en conséquence, on détermine sa présence dans le milieu de culture par un test ELISA positif (Fig. 30C).

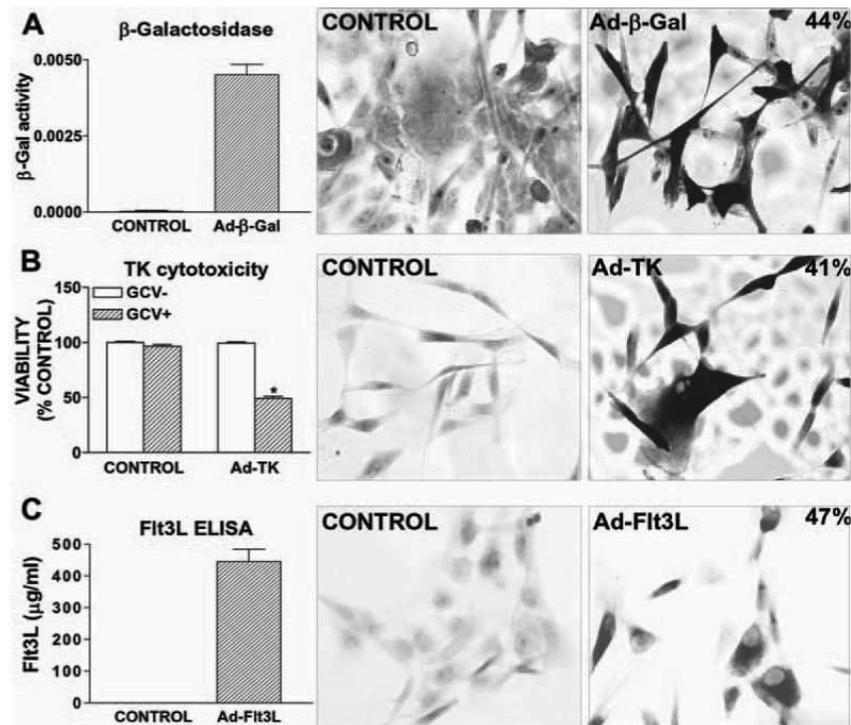


Figure 30. Expression in vitro de β Gal (A), HSV1-TK (B), et Flt3L (C) sur des cultures cellulaires de gliomes canins (Candolfi M, et al, 2007). Chaque culture a été infectée avec 30 pfu. A 72 h, les cultures font l'objet d'une observation immunochimique (photos) et des tests de bioefficacité (graphiques).

- CRAds et promoteur mCMV

Dans l'étude présente, on compare aussi l'efficacité du promoteur mCMV et hCMV. L'expression du transgène est détectée par l'activité β -galactosidique. Bien que cette activité ait été détectée en présence des deux vecteurs, elle est plus de 30 fois supérieure lorsque les cellules sont infectées avec Ad-mCMV- β -Gal. Le promoteur mCMV est donc plus efficace pour l'expression du transgène (Candolfi M et al, 2007). Ceci permettra de réduire la dose virale nécessaire à l'obtention d'un effet thérapeutique sans compromettre la sécurité du patient en augmentant la probabilité de réactions immunes ou inflammatoires adverses.

- HC-Ads

On teste la capacité des HC-Ads exprimant d'une part HSV1-TK ou d'autre part Flt3L, à transfecter des cellules de gliome canin.

Des cellules ont été infectées avec un HC-Ad exprimant HSV1-TK (HC-Ad-TK) sous le contrôle d'un promoteur mCMV ou hCMV à une dose de 1 TEP (transgene-expressing particle) par cellule. Après 48 h, l'expression du transgène est bien détectée par immunofluorescence. L'effet anti-tumoral est induit par incubation des cultures en présence de 10mM de GCV pendant 7 jours. L'incubation des cellules non transfectées en présence de GCV ne provoque pas d'effets cytotoxiques. Cependant sur des cellules transfectées on atteint une mortalité cellulaire de 90%. L'expression de HC-Ad-TK sans GCV cause approximativement 20% de mort cellulaire. Afin de déterminer si l'effet cytotoxique est lié à l'expression du transgène ou à l'infection par HC-Ad, les cellules de gliome ont été infectées par un HC-Ad-Lac Z exprimant β -gal sous le contrôle d'un promoteur mCMV, à la même dose que HC-Ad-TK, en présence ou non de GCV. Aucune toxicité n'a été constatée avec ce vecteur (Candolfi M et al, 2007).

Une deuxième population cellulaire a été infectée avec un HC-Ad-Flt3L sous contrôle d'un système TetON et d'un promoteur mCMV. Les cellules ont été incubées 48h en présence ou non de doxycycline (DOX). L'expression du transgène a été détectée par immunofluorescence et ELISA.

L'efficacité du système TetON a également été testée en infectant des cultures cellulaires avec un HC-Ad-TetON- β -gal. Lorsque les cellules sont incubées sans DOX, l'activité β -gal n'est détectée que sporadiquement. En revanche, en présence de l'inducteur, le vecteur déclenche une expression de β -gal dans la quasi totalité des cellules. L'expression est 70% plus forte lorsque le système TetON est précédé d'un promoteur mCMV, en comparaison d'un promoteur hCMV (Candolfi M et al, 2007).

Etant donné que l'approche thérapeutique des gliomes comprend la transduction des deux transgènes, TK et Flt3L, des cultures ont été infectées à l'aide des deux vecteurs HC-Ad-TK et HC-Ad-TetON-Flt3L en présence ou absence de DOX. Après 48 h, on détecte l'expression des deux transgènes par immunochimie et ELISA. La cytotoxicité de TK est déterminée après incubation des cellules avec du GCV (10 mM) et DOX pendant 48 h supplémentaires. L'efficacité transductionnelle d'HC-Ad-TK est similaire que le vecteur soit

administré seul ou avec HC-Ad-TetON-Flt3L (approximativement 25%). En absence de GCV, l'infection avec les deux vecteurs n'induit aucune cytotoxicité. De même la cytotoxicité observée en présence de GCV est semblable lors de l'infection par HC-Ad-TK ou des deux vecteurs. En ce qui concerne l'expression de Flt3L en présence de DOX, elle est plus faible que lors de l'infection par HC-Ad-TetON-Flt3L seul. Cependant au niveau de la transduction, l'efficacité n'est pas significativement réduite (Candolfi M et al, 2007).

De l'expression de HC-Ad-TK et HC-Ad-mTetON-Flt3L résulte une transduction effective des cellules de gliomes canins et un fort pouvoir cytotoxique combiné à GCV. Bien que l'HC-Ad-TK ne soit transduit qu'à 25%, la cytotoxicité atteint les 90% ce qui suggère l'intervention d'un effet by stander comme présenté précédemment.

La coinfection résulte en une diminution du taux de Flt3L produit, certainement par compétition vis à vis de la machinerie transcriptionnelle des cellules coinfectées. Cependant, étant donné que Flt3L stimule une réaction immunitaire et que HSV1-TK montre un fort effet by stander, un nombre limité de cellules a besoin d'être transduite pour que la thérapie soit efficace (Candolfi M et al, 2007).

b. In vivo

- Protocole (Candolfi M et al, 2007)

Étant donné le succès de l'expression des transgènes in vitro, les vecteurs ont ensuite été testés in vivo. L'étude est réalisée sur des beagles adultes élevés dans un milieu stérile et maintenus en isolement.

Les vecteurs sont administrés sous anesthésie générale par voie intra-craniale. Pour les analgésiques postopératoires on utilise du carprofène toutes les 12h00 et de la buprémorphine toutes les quatre à six heures suivant le besoin. On perce le crâne à cinq reprises entre le nasion et l'inion à un centimètre d'intervalle avec un diamètre de 1,5 mm. Le cathéter servant à l'injection des vecteurs est avancé dans le cortex cérébral sur deux centimètres dans un plan para médian.

En ce qui concerne la première étude, un chien a été injecté avec un adénovirus β -gal à promoteur humain, l'autre avec un promoteur murin. Dans les deux cas l'injection contient $8,3 \cdot 10^8$ pfu sous 50 μ l. Du sang et du liquide cérébro-spinal ont été collectés avant la chirurgie et 3 jours après. Sept jours après la chirurgie, les chiens ont été euthanasiés.

Pour la deuxième étude quatre chiens ont été utilisés. On leur administre des Ads

codant pour β Gal, HSV1-TK, ou Flt3L à une dose de 8×10^7 pfu/5 μ l par site d'injection. Une prise de sang est réalisée le jour de la chirurgie puis 24h après et enfin le jour de l'euthanasie. Sur ces prélèvements une numération formule, des analyses biochimiques, une recherche de Flt3L par ELISA et d'anticorps anti-adénovirus ont été effectués. La température rectale est prise quotidiennement au moment de l'examen clinique. De l'urine est prélevée par cystocentèse pendant la chirurgie et 3 jours après. Du liquide cérébro-spinal est collecté durant l'opération et après euthanasie dans la cisterna magna.

- Résultats

Le choix de forts promoteurs est essentiel à l'obtention d'un niveau d'expression élevé du transgène tout en réduisant les risques d'effets secondaires par la diminution des doses de vecteurs administrées. C'est pourquoi, dans la première étude présentée, on compare l'efficacité de différents promoteurs comme hCMV et mCMV. Dans cette étude, l'Ad-hCMV- β -gal a une aire de transduction de 1.6 mm² autour du site d'injection, alors que l'Ad-mCMV- β -Gal est exprimé sur une aire de 8 mm², ce qui est cinq fois plus grand. Ces résultats confirment ceux obtenus in vitro (Candolfi M et al, 2007).

La deuxième étude est donc réalisée avec des vecteurs comportant un promoteur mCMV. L'expression du transgène et l'infiltration des cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral sont déterminées par immunohistochimie. On détecte l'expression de tous les transgènes, β -Gal, HSV1-TK, et Flt3L. L'aire de transduction des vecteurs s'étend sur approximativement 5 à 10mm² autour des sites d'injection.

La bioactivité des transgènes est également vérifiée. L'activité de β -gal est détectée et ne cause pas d'effets cytotoxiques. La cytotoxicité en présence de GCV de HSV-TK est observée en présence des deux composants. Les cellules de gliome canin sont aussi capables après transduction de sécréter Flt3L. Sept jours après l'administration intra-craniale de β -gal, TK, et Flt3L sont exprimés dans le cerveau du chien, principalement dans les astrocytes (Candolfi M et al, 2007). Ces résultats montrent que les CRAds sont des vecteurs de gènes thérapeutiques efficaces dans le cerveau canin.

- Innocuité

Trois jours après la chirurgie, le chien ayant reçu l'injection de Ad-TK et Ad-Flt3L a eu une légère hyperthermie sur une période de 24h, et, vers la fin de l'étude au jour 6, le chien injecté avec Ad- β gal a présenté une hyperthermie moyenne.

Toutes les valeurs hématologiques et biochimiques sont dans les valeurs usuelles et aucune anomalie n'est détectée dans les urines non plus. Ceci à l'exception d'une lymphocytose modérée 24h après la chirurgie sur le chien injecté avec Ad-βgal, et une neutrophilie modérée le jour de la chirurgie sur celui ayant reçu Ad-TK et Ad-Flt3L. Cependant ces valeurs sont retournées dans les valeurs usuelles dès le prélèvement suivant. Aucun anticorps sérique anti-Ad n'a été détecté pour des chiens de l'étude (Candolfi M et al, 2007).

L'analyse du liquide cérébro-spinal indique que 7 jours après la chirurgie, la cellularité des prélèvements est plus élevée avec présence de globules rouges et d'une population cellulaire mononuclée. Les autres paramètres tels que la couleur, la viscosité et la turbidité sont constants. On constate également une infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral aux sites d'injection.

L'élévation de la température corporelle mise en évidence à la fin de l'étude, associée à la cellularité du liquide cérébro-spinal et l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral, peut être due à une réponse immune locale au vecteur. Cette réponse transitoire est caractérisée par une augmentation du taux de cytokines, TNF-α (tumor necrosis factor-α), IL1 (interleukin-1), et IL6 (interleukin-6) ainsi que par l'infiltration de cellules inflammatoires telles que des macrophages, des neutrophiles, des cellules NK (natural killer) et des lymphocytes. Des études précédentes démontrent sur les souris que cette réponse locale n'influe pas sur l'expression du transgène dans le cerveau (Candolfi M et al, 2007).

Bien que l'expression du transgène avec Ad-mCMV-β-Gal soit plus importante qu'avec Ad-hCMV-b-Gal, l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral au site d'injection est similaire pour les deux vecteurs. Ces résultats montrent que la dose utilisée ($8,3 \cdot 10^7$ pfu) est bien tolérée et n'induit pas d'effets secondaires cliniquement observables à court terme, cependant des études de plus longues durées sont nécessaires pour certifier la sécurité d'utilisation de ces vecteurs.

En résumé, ces résultats montrent que le promoteur murin est plus efficace sur les gliomes que le promoteur humain in vitro comme in vivo, et ce quelque soit le vecteur utilisé (CRAds ou HC-Ads). Les données montrent également que HC-Ad est un vecteur efficace in vitro et mériterait d'être testé in vivo sur des chiens atteints de gliomes.

IV. Potentialisation des thérapies conventionnelles : potentialisation de la radiothérapie sur le cancer de la prostate

A. Vecteur et transgène

1. Le virus utilisé

Il s'agit d'un CRAds de type 5 délété en E1 et E3, avec introduction du gène *lacZ* comme dans les études précédentes. Le vecteur est appelé AdRSVlacZ (Carraher J et al 1999).

Les cellules de l'organisme peuvent avoir un peu de β -gal dans leur cytoplasme à l'état physiologique. Cependant le génome du vecteur viral suit le mode de réplication du virus et s'exprime uniquement, dans le cas d'un adénovirus, dans le noyau. Ceci permet de différencier l'activité β -gal engendrée par le vecteur de celle présente à l'état physiologique.

Ce gène ainsi introduit permet de tester, dans une première étape l'efficacité du vecteur, et de comparer cette efficacité en fonction de différentes voies d'administration.

2. Principe du gène thérapeutique (Perricaudet M et al, 2007)

On utilise le même vecteur que présenté ci dessus en remplaçant le gène *lacZ* par un gène à visée thérapeutique. Il s'agit d'un gène codant pour le transporteur spécifique de l'iode : le Na⁺/I⁻ Symporteur, NIS, sous le contrôle d'un promoteur viral, CMV. L'objectif est de favoriser l'accumulation d'iode dans les cellules tumorales. Le NIS est responsable de la concentration de l'iode circulant (sous forme d'iodure I) par les thyrocytes. L'introduction du gène codant pour ce transporteur dans des cellules non thyroïdiennes leur confère la capacité à capter l'iode, avec les mêmes propriétés que les thyrocytes (Perricaudet M et al, 2007).

L'I¹²³ est utilisé comme marqueur radiographique, l'accumulation de cet iode dans les cellules va permettre d'évaluer l'expression du NIS suite à l'expression du transgène. Ce point est particulièrement intéressant. En effet, la plupart des techniques actuelles de détection de la biodistribution du vecteur viral sont très invasives. L'expression de NIS en revanche va pouvoir être suivie par imagerie de façon non invasive (Perricaudet M et al, 2007).

L'I¹³¹ est utilisé depuis plus de cinquante ans dans le traitement des cancers différenciés de la thyroïde. Son efficacité thérapeutique est liée à la dose de radiations délivrée au tissu tumoral. Par exemple dans le cas de métastases, une réponse tumorale après traitement par l'I¹³¹ est observée lorsque la dose délivrée au niveau du tissu tumoral est supérieure à 80 grays alors que le taux de réponse tumorale est faible ou nul pour des doses inférieures à 35 grays. On peut généralement estimer que les doses totales nécessaires pour traiter ou réduire le volume d'une tumeur varient entre 40 et 60 grays en fonction de leur radiosensibilité. Cette dose totale peut être délivrée lors de plusieurs traitements par l'I¹³¹ (Perricaudet M et al, 2007).

La dose de radiation délivrée au tissu tumoral dépend de deux facteurs biologiques : la demi-vie effective (T eff) de l' I¹³¹ dans le tissu tumoral et la concentration radioactive. La T eff dans un tissu tumoral est de quelques heures à quelques dizaines d'heures. La fixation globale d' I¹³¹ est un paramètre qui dépend d'une part, de l'activité de l'I¹³¹ administrée au patient et d'autre part, des capacités du tissu tumoral à concentrer I¹³¹. L'activité maximale d' I¹³¹ pouvant être administrée à un patient est limitée par la toxicité de l' I¹³¹ résultant des doses d'irradiation délivrées aux tissus sains et notamment à la moelle osseuse. La capacité du tissu tumoral à concentrer l' I¹³¹, pour une activité déterminée administrée au patient, va dépendre du niveau d'expression du NIS et de son activité biologique (Perricaudet M et al, 2007).

La dose d'irradiation au niveau du tissu tumoral est délivrée essentiellement par l'émission β de l'I¹³¹. Or son parcours dans les tissus biologiques est au maximum de 3 mm. De plus, autour d'une source ponctuelle, la dose d'irradiation diminue de manière exponentielle avec la distance. Ces éléments renforcent l'importance d'atteindre une forte concentration radioactive au niveau des zones tumorales avec une fixation d'iode aussi homogène que possible (Perricaudet M et al, 2007).

B. Choisir une voie d'administration (Carraher J et al, 1999)

Le moyen idéal pour cibler au mieux le tissu tumoral serait d'utiliser des promoteurs spécifiques. Cependant, des progrès restent à faire dans ce domaine avant d'en envisager la possibilité. Une autre approche consiste à évaluer les différentes voies possibles d'administration. Dans l'étude présentée ci-dessous, trois voies ont été comparées dans le but d'obtenir un maximum d'efficacité de transduction du gène transmis avec un minimum de dissémination systémique.

1. Protocole (Carraher J et al 1999)

Les chiens sont des beagles, d'une moyenne d'âge de un an et demi, et d'un poids moyen de 22kg. Une injection d'1ml de solution saline contenant $4.83 \cdot 10^9$ pfu (plaque-forming units) d'AdRSVlacZ a été réalisée sur les chiens sous anesthésie générale. Les différents protocoles d'injection, utilisés chacun sur un chien, sont les suivants :

- injection en intraveineuse (IV) dans la veine céphalique du membre antérieur gauche
- laparotomie et injection intra-artérielle (IA) dans les artères iliaques gauche et droite à raison de 0,5mL par artère
- laparotomie et injection intra-prostatique (IP) à raison de 4 injections de 0,25mL, une par cadran prostatique

Un des chiens sert de témoin et ne reçoit aucune injection. Les animaux sont euthanasiés 72h après l'injection et autopsiés avec prélèvement d'organes (prostata, foie, rate, vessie, reins, cœur, poumons, testicules et canaux déférents).

2. Expression du transgène dans la prostate

Différentes techniques ont été employées pour vérifier l'expansion du transgène dans la prostate.

A l'essai colorimétrique X-gal qui mesure l'activité enzymatique de β -gal, aucune expression du gène *lacZ* n'a été détectée dans la prostate après IV, une faible (5% des cellules) après IA, et une plus forte (30% des cellules) après IP (Carraher J et al 1999).

Le graphique suivant montre que suite à l'IP l'activité de β -gal est 7.5 fois supérieure à celle obtenue après l'IV et 2,4 fois supérieure à celle obtenue après l'IA (Carraher J et al 1999).

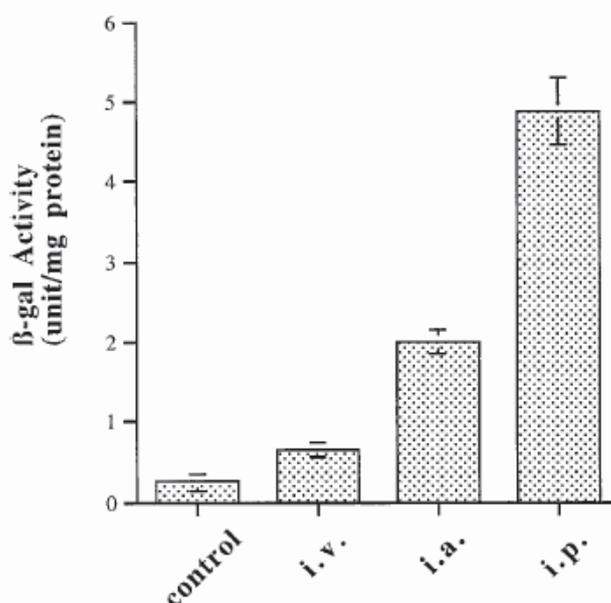


Figure 31. Activité β -gal dans la prostate selon la voie d'administration (CARRAHER J et al, 1999)

L'analyse PCR du chien à IP s'est révélée fortement positive à l'opposée des IA et IV pour lesquelles on ne distingue que de faibles traces de l'ADN du transgène.

Ces résultats démontrent que le taux de transduction est nettement supérieur par la voie IP (Carraher J et al 1999).

3. Dissémination dans l'organisme

La dissémination aux autres organes est étudiée par l'analyse PCR des échantillons prélevés lors de l'autopsie. Chez l'animal injecté en IV, les poumons et les artères iliaques sont infectés. En IA, de multiples organes sont contaminés, les plus fortes traces étant

retrouvées sur les poumons, la vessie, les canaux déférents, les artères iliaques (site de l'injection). Et d'autres traces plus faibles sur le foie, la rate et les reins. Cette distribution correspond aux organes qui reçoivent le plus de volume sanguin cardiaque et sont donc les plus susceptibles d'être infectés (Car J et al 1999).

En revanche sur le chien injecté en IP on a une dissémination mineure avec la présence de faibles traces sur les canaux déférents et les artères iliaques.

Cependant, si des traces ADN sont relevées, aucun de ces organes n'est positif à la colorimétrie par X-gal. Ceci suggère que le niveau de la transduction est assez faible pour ne pas être significatif au niveau clinique (Carragher J et al 1999).

Les résultats de cette étude montrent donc que l'IP semble être la meilleure voie d'administration pour une bonne expression du transgène avec une moindre dissémination dans l'organisme.

C. Efficacité IP (Weld KJ et al, 2002)

L'importance de la vascularisation de la prostate et sa variabilité rendent difficile la prévision de la distribution du vecteur viral introduit dans cet organe (Weld KJ et al, 2002). La mesure de l'activité β -gal fournit des données quantitatives pour évaluer le transfert génique et son expression. L'objectif de cette étude est d'évaluer une technique d'injection intra-prostatique avec différentes quantités de virus et d'observer la dissémination systémique consécutive à cette voie d'administration.

1. Protocole (Weld KJ et al, 2002)

Deux groupes de deux chiens reçoivent des injections d'AdRSVlacZ. Le premier groupe, comportant les chiens CN1.1 et CN1.2, reçoit au total $4.8 \cdot 10^9$ pfu dilués dans 1mL de diluant (2 injections de 0.5mL). Le second groupe, composé des chiens CN2.1 et CN2.2, reçoit la même dose de vecteurs mais dilués dans 2mL de solution (2 injections de 1mL).

L'administration du vecteur se déroule de la façon suivante. Après anesthésie, on réalise une biopsie de la prostate par voie transrectale à l'aide d'une aiguille et sous échographie. Après la biopsie on injecte sur le site même de celle-ci en remontant lentement sur 2-3s en visualisant à l'échographe la distribution du produit tout le long du conduit formé par la biopsie. Cette opération est réalisée deux fois, une de chaque côté de la prostate.

L'animal servant de témoin reçoit 1mL de diluant à chacun des points d'injection. Des prélèvements buccaux et rectaux sont réalisés à l'aide de coton-tige, ainsi que des prélèvements urinaires par cathétérisme ou cytoponction. Ils sont effectués au temps 0, 15mn, 1h, 4h, 24h, 48h, et 72h après l'injection.

Les animaux sont euthanasiés 72h après l'injection. A l'autopsie on prélève les organes suivants: foie, rate, reins, cœur, poumons, testicules, conduits déférents, et nœuds lymphatiques mésentériques. On prélève également des échantillons de prostate et tissu péri-prostatique, vessie, urètre, rectum, cerveau, veine hypogastrique et des nœuds lymphatiques pelviens.

2. Résultats

Comme pour l'expérience précédente, l'activité de β -gal sert de marqueur pour vérifier l'expression du transgène. Tous les animaux traités montrent une activité de β -gal significativement plus élevée que celle du chien témoin. En revanche, le niveau d'expression n'était pas significativement différent entre les chiens du groupe 1 et du groupe 2 n'ayant pas reçu le même volume d'injection (Weld KJ et al, 2002).

Au niveau du tissu prostatique les bandes d'ADN viral trouvées par PCR sont d'autant plus marquées que l'on se rapproche du point d'injection.

La présence d'ADN viral et d'activité β -galactosidase dans les tissus adjacents au site d'injection suggèrent que le vecteur atteint un volume de prostate d'environ 1.5cm de diamètre (Weld KJ et al, 2002).

3. Dissémination

La présence et l'expression du transgène est contrôlée par la présence ou l'absence d'effets cytopathiques (CPE) après mise en culture des échantillons. Les CPE apparaissant dans les premières 24h ne sont pas considérées comme significatifs mais plutôt reliés à une mauvaise mise en culture. Les lysats des cultures CPE positives sont testés par PCR pour confirmer la présence de l'ADN du vecteur.

Les cultures des tissus obtenus sur l'animal témoin ne présentent pas de CPE. En revanche sur tous les chiens traités, les cultures des prélèvements de la vessie, des testicules,

des canaux déférents, de l'urètre, du rectum, des nœuds lymphatiques mésentériques et du tissu cardiaque présentent des CPE avec confirmations PCR positives. On observe également une dissémination aux, poumons, aux reins et au foie pour les chiens CN 1.2 et CN 2.2. (Weld KJ et al, 2002).

Aucune contamination du tissu cérébral n'est notée. De même les échantillons salivaires, et urinaires ne présentent quasiment pas de CPE et lorsque c'est le cas les PCR sont uniformément négatives.

Chez tous les animaux traités on a une dissémination au niveau de l'appareil urogénital et au niveau du rectum. Cette dissémination est prévisible en raison de la continuité anatomique de la prostate avec l'appareil urogénital et le fait que la biopsie/injection ait été effectuée en transrectale ce qui rend possible le reflux le long du conduit créé.

Un certain degré de dissémination systémique a cependant été observé dans l'organisme. Dans le cas d'une tumeur prostatique, la vascularisation sanguine et lymphatique est généralement plus importante. On peut donc envisager un risque de dissémination plus important dans l'organisme (Weld KJ et al, 2002).

D. Utilisation thérapeutique : radiographie et radiothérapie métabolique (Dwyer R et al 2005)

1. Protocole (Dwyer R et al, 2005)

L'étude s'effectue sur 4 chiens beagles, jeunes adultes. Huit jours avant l'injection du vecteur, les chiens reçoivent par voie orale un traitement quotidien à base de T3 afin de limiter l'accumulation d'iode au niveau de la thyroïde durant le traitement.

Les injections sont réalisées sous anesthésie générale par laparotomie et injection IP. On injecte pour 3 des chiens une dose totale de 1.10^{12} ufp en plusieurs points pour obtenir une expression maximale du transgène dans la prostate. Pour le quatrième chien servant de témoin, le même protocole est suivi avec injection du diluant uniquement.

Chaque animal reçoit une injection d'I¹²³ administré à J3, trois jours après l'injection du vecteur. L'examen par imagerie est lui aussi réalisé sous anesthésie générale et à plusieurs reprises à 1, 3, 5, 24, et 48h après l'injection d'I¹²³.

Six jours après l'injection du vecteur, l'I¹³¹ est administré. La radioactivité résiduelle de la seringue après injection est prise en compte afin de déterminer pour chaque animal la

dose exacte reçue. Sept jours après l'injection d'I¹³¹, les animaux sont euthanasiés et les organes, repérés à l'imagerie comme ayant emmagasiné l'I¹²³, sont prélevés.

Tout au long de l'expérience les chiens sont évalués cliniquement trois fois par jour et leur poids est également suivi. Des prélèvements sanguins sont réalisés au jour 0 et 13 (jour de l'euthanasie).

2. Résultats

A l'imagerie, quatre zones de fixation de l'iode sont visibles chez les chiens traités : la thyroïde, la vessie (voie d'élimination de l'iode), l'estomac (dans lequel NIS est exprimé naturellement), et la prostate. En revanche le chien témoin ne présente pas d'accumulation au niveau de la prostate. Ces résultats de scintigraphie montrent que les vecteurs permettent d'acquérir une fixation importante de l'iode au niveau de la prostate (Dwyer R et al, 2005).

En adaptant les données humaines, la dose moyenne absorbée par la prostate devrait être de 23cGy pour 1mCi I¹³¹ en IV (Dwyer R et al, 2005). Ce qui signifie qu'une dose de 85 mCi serait suffisante pour atteindre les 2000cGy voulus dans la prostate, ce qui est nettement inférieur à la dose de 200mCi utilisée.

A l'histopathologie, les échantillons de prostate du chien témoin sont considérablement différents de ceux des chiens traités. Chez le chien témoin, la réponse inflammatoire est marquée par une prédominance des neutrophiles et macrophages. Chez les chiens traités, les lymphocytes et les macrophages sont prédominants et on observe également des plages nécrotiques, hémorragiques et thrombotiques, ainsi que des vascularites (Dwyer R et al, 2005).

3. Innocuité

Aucune toxicité n'a été constatée durant cette étude. Un des animaux (No. 385) a développé une hyperthermie après la chirurgie avec une infection au niveau de la cicatrice, épisode vite résolu suite à l'administration d'antibiotiques. Les analyses sanguines réalisées à J0 et J13 n'ont montré aucun changement significatif lié à la thérapie (Dwyer R et al, 2005).

L'absence de modifications significatives notamment au niveau des enzymes hépatiques et de l'analyse histopathologique des foies des animaux permet de soutenir l'absence d'hépatotoxicité de ce traitement (Dwyer R et al, 2005).

A l'examen histopathologique de la vessie on note une inflammation granulomateuse chez l'animal témoin sans doute du fait de l'injection dans la prostate adjacente. Les changements sur la vessie des animaux traités peuvent être associés soit à l'inflammation de la prostate, soit à une fuite au moment de l'injection virale.

Les effets secondaires liés à la thérapie par I^{131} sont généralement peu sévères et de courte durée (Dwyer R et al, 2005). Les résultats de cette étude confortent cette idée et permettent d'envisager des essais cliniques de cette thérapie.

E. Conclusion

La découverte qu'il est effectivement possible de concentrer de manière importante l'iode dans des cellules tumorales, qui sont normalement incapables d'accumuler cet élément permet d'envisager l'application de cette méthode dans de nombreuses indications pour le traitement des tumeurs d'origine non thyroïdienne. L'intérêt majeur de la radiothérapie métabolique est de délivrer des doses d'irradiation importantes aux tissus fixant l'isotope radioactif, sans irradier significativement les tissus environnants.

Deux types d'application sont plus particulièrement envisagés : (i) les tumeurs ayant déjà été irradiées et pour lesquelles un complément de radiothérapie externe est impossible, car les doses maximales ont déjà été délivrées : ceci concernant tous les cancers survenant ou rechutant en zones irradiées. (ii) les tumeurs difficilement accessibles à la radiothérapie externe en raison de leur localisation, à titre d'exemple on peut citer les cancers de la prostate inopérables ou les tumeurs intracérébrales.

Troisième partie : Limites et perspectives

Il ressort de ces études que de très nombreux types de virus pourraient être utilisés. Il s'agit donc de définir des critères d'efficacité de ces différents virus oncolytiques, d'assurer une certaine sécurité de leur utilisation, ainsi que de voir si de telles thérapies sont matériellement et financièrement envisageables.

I. Limites d'utilisation

A. Prévoir l'efficacité d'un virus oncolytique

Comme nous avons pu le constater au cours de la partie précédente, les variations d'efficacité sont conséquentes selon le type de tumeur et le type de virus employé, mais aussi de la voie d'administration utilisée.

Les voies d'administrations possibles sont multiples : administration intra tumorale directe, intracavitaire, intramusculaire, intraveineuse (IV) ou artérielle,... L'efficacité est généralement optimale avec une injection intra tumorale qui permet également un minimum de dissémination. Cependant dans l'optique de traiter également des métastases ou des tumeurs non accessibles facilement pour l'injection, l'intraveineuse montre une certaine efficacité associée cependant à une dissémination plus importante dans l'organisme dont les conséquences restent à évaluer.

Une autre raison des variations d'efficacité dans les résultats obtenus provient de la nature même des tumeurs. Une masse tumorale est d'une architecture cellulaire complexe possédant une vascularisation inégale avec des plages de nécrose, d'hypoxie, d'autres de tissus normaux,... Cette variabilité au sein même de la tumeur peut compromettre la bonne diffusion du vecteur et l'expression d'un transgène (Vähä-Koskela M. et al, 2007)

De fait, afin d'améliorer l'effet anti-tumoral les principaux facteurs d'efficacité à prendre en compte sont (Hakkarainen et Hemminki, 2005):

1. Le ciblage de la transduction des agents thérapeutiques aux cellules cancéreuses et à des activités spécifiques à la tumeur
2. La dissémination intra tumorale des agents thérapeutiques de préférence avec des virus traçables *in vivo* pour obtenir un maximum de données corrélatives

3. Le développement d'agents autorisant des administrations répétées sans mise en place d'une réponse immunitaire contre le traitement
4. Enfin, pour optimiser l'efficacité des virus oncolytiques on peut combiner l'injection de virus avec un traitement par les thérapies conventionnelles (chimio- et radiothérapie externe ou métabolique comme vu précédemment avec le NIS). Cette combinaison permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie, sans en augmenter la toxicité. Cette combinaison paraît particulièrement intéressante pour les tumeurs peu sensibles à la radiothérapie.

Le véritable obstacle qui subsiste aujourd'hui en virothérapie reste l'élimination des virus par les défenses de l'hôte avant qu'il ne puisse atteindre et endommager les tumeurs (surtout dans une volonté de cibler les sites métastatiques via une administration IV). L'effet oncolytique des virus est souvent limité par la réponse immunitaire, qu'elle soit acquise préalablement ou suite au traitement.

B. Interaction avec le système immunitaire de l'hôte

a. Immunité pré-acquise

L'immunité pré-acquise contre un virus thérapeutique concerne les virus avec lesquels les patients ont déjà été en contact et pour certains de façon régulière. En effet, parmi les virus présentés on trouve des agents pathogènes de l'espèce étudiée contre lesquels les patients peuvent être vaccinés. C'est notamment le cas pour les virus de la maladie de carré (CDV), de la toux du chenil (CAV2),... contre lesquels la majorité des chiens sont vaccinés (Smith BF et al, 2006) et (Sutter S.E et al, 2005).

La présence d'anticorps circulants peut compromettre l'efficacité thérapeutique des virus utilisés. Cependant, des études récentes semblent montrer que l'efficacité de vecteurs comme les CRAds, les herpèsvirus, et réovirus, n'est pas diminuée par l'existence préalable d'anticorps.

b. Immunité acquise

La plupart des virus, même recombinés, sont immunogènes. Un virus oncolytique peut être administré localement, par inoculation intra-tumorale, ou de façon systémique, par injection intra-vasculaire. Il semblerait que la réponse immunitaire tendrait à limiter

l'efficacité d'un virus oncolytique administré par voie vasculaire en l'empêchant d'atteindre la tumeur, alors qu'une fois que celui-ci a atteint sa cible et commence à s'y répliquer, la réponse immunitaire serait plutôt bénéfique puisqu'elle contribuerait à la réduction tumorale (Szelechowski M et al 2005). Une administration intra-tumorale, nécessitant une plus faible dose de particules à injecter et permettant d'échapper en partie à la barrière immunitaire précoce, paraît être nettement préférable. Néanmoins, pour le traitement de métastases diffuses, les avantages d'une injection intra-vasculaire ne peuvent être omis.

La plus grande part de l'inefficacité de ces thérapies est due à une inactivation du virus ou du vecteur par la réponse immunitaire de l'hôte (Hakkarainen et Hemminki, 2005). De nombreuses et complexes interactions virus-hôte modulent la réplication virale dans le cadre de la réponse immunitaire. Cette réponse antivirale limite l'infection chez l'hôte en favorisant l'élimination des virus et diminue donc sensiblement l'efficacité du traitement.

Les adénovirus et les poxvirus notamment, possèdent une très forte immunogénicité et provoquent donc de fortes réactions immunitaires qui peuvent limiter l'efficacité thérapeutique du virus, d'où l'intérêt de tester le virus chez des animaux présentant une immunosuppression (cf partie 2 I.C.3.) pour améliorer la diffusion du virus et sa potentialité anti-tumorale (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

De plus, l'utilisation de ces virus pourrait nécessiter des réadministrations pour une meilleure efficacité du traitement, augmentant ainsi le risque de réactions adverses du système immunitaire.

Deux stratégies peuvent être envisagées pour contrecarrer ces effets indésirables de la réponse immunitaire : l'utilisation temporaire de suppresseurs de l'immunité de l'hôte ou bien l'utilisation de capsides protéiques voire de virus de différentes espèces ou de différents sérotypes lors de réadministrations notamment.

Cependant, cette immunité peut se trouver dirigée contre les cellules tumorales infectées. Elle permet alors le développement d'une immunité acquise, possiblement à long terme, contre les cellules cancéreuses ; c'est le principe utilisé dans l'optique de créer des vaccins anti-tumoraux à partir de vecteurs viraux (Szelechowski M et al 2005). L'interférence de la réponse immunitaire avec le traitement des tumeurs par virus oncolytiques nécessite donc une attention toute particulière.

C. Biosécurité

L'utilisation de virus oncolytiques en tant qu'agents thérapeutiques contre le cancer soulève en outre d'autres questions importantes. En effet, les virus sont par essence des parasites de cellules eucaryotes et leur injection dans les organes peut se révéler être une véritable bombe à retardement. Plusieurs propriétés fondamentales des virus peuvent présenter un danger majeur.

Tout d'abord, les virus ont une grande capacité à se recombiner, ce qui peut faire réapparaître une souche sauvage du virus vecteur. Le génome viral peut aussi muter très rapidement au sein même de l'hôte pour devenir pathogène. Il est donc très important de connaître, à défaut de pouvoir contrôler ces mutations autonomes, un moyen d'éliminer rapidement toute trace du virus sous sa forme pathogène après le traitement (Szelechowski M et al 2005).

La plupart des virus étudiés pour leurs potentialités oncolytiques ne sont pas des virus intégratifs, mais certains d'entre eux sont connus pour pouvoir s'intégrer au génome cellulaire dans des zones transcriptionnellement actives. Une telle intégration du génome viral, si elle permet une expression du transgène plus stable dans la durée, empêche cependant tout contrôle sur sa présence et sa multiplication au sein des cellules du patient (Vähä-Koskela M. et al, 2007).

Les réactions immunitaires de l'hôte interviennent également dans la sécurité d'utilisation du vecteur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'existence préalable d'anticorps ou la réadministration des virus peut entraîner des réactions adverses de l'organisme mettant en jeu la santé du patient.

Enfin, la plupart des études vues en deuxième partie montrent une certaine dissémination des vecteurs dans les organismes. Malgré la faible toxicité à court terme constatée, cette dissémination pose la question d'éventuels effets secondaires à plus long terme.

D. Limites pratiques/ Matériel

Dans la pratique le principal inconvénient est la difficulté de clonage des virus. Or les doses de virus à injecter, bien que minimisées pour certains, sont néanmoins importantes. Le prix d'une telle production serait bien trop élevé pour une éventuelle utilisation courante en médecine vétérinaire. De plus, cette technique nécessite une garantie du respect de la chaîne du froid, élément également coûteux et difficilement envisageable à grande échelle.

II. Les carnivores domestiques : un modèle animal pour l'homme

La plupart des études présentées ont été réalisées dans le but de servir de modèle thérapeutique pour les cancers humains. Pourtant le modèle le plus utilisé en médecine humaine jusque là est le modèle murin. En quoi les carnivores domestiques pourraient t'ils être un meilleur modèle ?

A. Les limites des modèles murins immunodéficients

L'un des inconvénients majeurs des modèles murins est leur immunodéfiance. D'une part, les tumeurs sont implantées sur des souris porteuses et ne reflètent donc pas le développement spontané des tumeurs naturelles (Candolfi M et al, 2007).

D'autre part, l'immunodéfiance de ces modèles, nécessaire à la greffe des tumeurs, interdit l'étude des interactions de la thérapie avec le système immunitaire de l'hôte (Candolfi M et al, 2007). Interaction qui, nous l'avons vu précédemment, joue un rôle majeur et complexe dans l'efficacité thérapeutique du virus.

Pour ces raisons, les résultats obtenus sur des modèles murins sont souvent peu représentatifs et ne permettent pas de prévoir les réels effets pouvant être obtenus chez les patients.

B. Le chien un modèle plus ressemblant

La haute prévalence et la diversité des cancers canins ainsi que leur ressemblance avec les cancers humains font des carnivores domestiques et notamment du chien un modèle d'études comparatives idéal pour les nouvelles thérapeutiques anticancéreuses.

Les chiens vivent avec les hommes, leur génome et donc exposé aux mêmes influences que le génome humain. Ceci explique les multiples similarités physiopathologiques constatées entre les cancers humains et canins, notamment au niveau des ostéosarcomes (Smtih BF et al, 2006), des gliomes,... (Candolfi M et al, 2007).

Mais la ressemblance ne s'arrête pas là. En effet, comme nous avons pu le constater dans les études présentées, beaucoup des virus utilisés sont très proches : les morbillivirus de la rougeole (MDV) et de la maladie de carré (CDV), les adénovirus canins et humains,...

Leurs propriétés sont si semblables que certaines études prévoient des essais d'utilisation de virus canins en virothérapie humaine, ce qui pourrait permettre de diminuer les risques en matière de biosécurité (Smith BF et al, 2006).

De plus contrairement aux modèles murins utilisés actuellement, les chiens étudiés sont naturellement atteints de cancers et non immunodéficients. Ainsi, même si les réactions immunes peuvent varier par rapport à celles de l'homme et ne permettent donc pas de prévoir les conséquences de l'infection par un virus thérapeutique avec exactitude, on a un modèle plus proche de l'être humain qu'avec une souris immunodéficiente et une tumeur greffée.

Enfin les études menées sur des patients canins permettraient non seulement d'ouvrir le chemin pour des possibilités thérapeutiques humaines mais également d'envisager une application directe en médecine vétérinaire avec des suivis à long terme sur des animaux exposés à des conditions de vies plus semblables aux nôtres.

Conclusion

Avec le perfectionnement de la médecine vétérinaire, l'espérance de vie des animaux s'allonge et les maladies comme le cancer se font plus nombreuses et représentent une part non négligeable des consultations. Les techniques actuelles restent pour la plupart très invasives : chirurgies invasives, chimiothérapie avec de nombreux effets secondaires, et ce pour des résultats souvent peu probants. L'apport thérapeutique potentiel des virus oncolytiques représente une avancée conséquente et surtout l'apport d'une nouvelle technologie moins invasive pour lutter contre ce fléau. Les premiers résultats sont très encourageants. Malgré cela de nombreuses études restent à mener. En effet, peu de données sont disponibles sur les éventuels effets à long terme de tels traitements et des problèmes matériels pourraient freiner le développement en milieu vétérinaire de tels agents thérapeutiques (production, coût,..).

La compréhension de la machinerie biomoléculaire offre des perspectives inégalées dans la recherche de nouveaux moyens de lutte contre le cancer. La plupart des études menées révèlent une grande efficacité oncolytique des virus étudiés. De nouvelles études portant sur la biosécurité sur un plus long terme sont en cours, notamment en ce qui concerne l'utilisation des adénovirus contre les ostéosarcomes (Smith BF et al 2006).

A terme, les possibilités offertes par l'utilisation des virus en tant qu'agents thérapeutiques sont nombreuses et variées. Les expériences présentées dans cet ouvrage montrent déjà un certain degré d'efficacité dans la lutte contre le cancer. Cependant, l'utilité des virus ne s'arrête pas là, et avec leurs caractéristiques, de multiples utilisations sont envisageables contre d'autres maladies. Ils sont d'ailleurs déjà étudiés en médecine humaine dans le cadre de nombreuses maladies notamment génétiques. La connaissance de leur mode de fonctionnement, et de celui des maladies, permet presque de tout envisager sur le papier. Le plus difficile reste la mise en pratique, devant tenir compte des multiples facettes des interactions virus-hôte (système immunitaire, toxicité...).

Bibliographie

1. ARENDT M, NASIR L, MORGAN M
Oncolytic gene therapy for canine cancers : teaching old dog viruses new tricks
Vet Comp Oncol, septembre 2009, **7**, 3, 153-161

2. BERGMANN P.
Anticancer vaccines
Vet. Clin. NA: Small Anl Prac., novembre 2007, **37**, 6, 1111-1119

3. CANDOLFI M, PLUHAR GE, KROEGER K, et al
Adenoviral-mediated Gene Transfer into the Canine Brain In Vivo
Neurosurgery, janvier 2007 , **60**(1), 167–178

4. CANDOLFI M, PLUHAR GE, KROEGER K, et al
Optimization of adenoviral vector-mediated transgene expression in the canine brain in vivo, and in canine glioma cells in vitro
Neuro Oncol., juillet 2007, **9**, 3, 245-258

5. CARRAHER J, YU ZHANG, JIANLING ARMSTRONG, et al
Delivery of adenoviral vectors to the prostate for gene therapy
Cancer Gene Ther., janvier 1999, **6**, 1, 64-72

6. CHAUVET AE, KESAVA PP, GOH CS, BADIE B.
Selective intraarterial gene delivery into a canine meningioma
J Neurosurg., mai 1998, **88**, 5, 870-873

7. COLLOT-TEIXEIRA Sophie

Implication de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) dans la lymphomogénèse du lymphome de Hodgkin : Rôle de l'oncogène viral DR7.

Th. D : Biologie, Sciences, Santé : Limoges, Université de Limoges : novembre 2003 ; <http://www.unilim.fr/theses/2003/sciences/2003limo0017/these.html>

8. DECOSTER A., LEMAHIEU JC, PEIGUE-LAFEUILLE H

Rhabdoviridés : Cours de virologie Systématique

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/rhabdoviridae.html>

9. DECOSTER Anne

Paramyxovirus

<http://anne.decoster.free.fr/d1viro/vparamyx.html>

10. DELEU L, DAEFFLER L, FAISST S, et al

Action oncolytique de parvovirus de rongeurs

Virologie, février 2002, **6**, 1, 29-40

11. DWYER RM, SCHATZ SM, BERGERT ER, et al

A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer

Mol Ther., novembre 2005, **12**, 5, 835-841

12. ELOIT Marc

Cours de virologie: Les Poxvirus

Faculté de médecine de Créteil, 2007

<http://www.carabin.fr/~telech//cours/DCEM%201/bacterio/viro3.pdf>

13. FOILLARD Stéphanie
Synthèse de Nouveaux Vecteurs Peptidiques pour la Thérapie Anticancéreuse et l'Imagerie Tumorale.
Th. D : Chimie-Biologie : Grenoble, Université Joseph Fourier : mars 2008; 176p.
14. GENTSCHEV I, STRITZKER J, HOFMANN E, et al
Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent
Cancer Gene Ther., avril 2009, **16**, 4, 320-328
15. GRETILLAT Magalie
Etude d'un virus myxomateux optimisé pour la virothérapie anticancéreuse chez l'Homme
Th. D : Microbiologie : Toulouse, Université Paul Sabatier : octobre 2009; 221p.
16. HAKKARAINEN T., HEMMINKI A.
Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes
Gene Ther Mol Biol, 2005, **9**, B, 153-168
17. HATEFI A, CANINE B F
Perspectives in vector development for systemic cancer gene therapy
Gene Ther. Mol. Biol., 2009, **13**, 15-19
18. HEMMINKI A, KANERVA A, KREMER EJ, et al
A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model.
Mol Ther., février 2003,**7**, 2,163-173

19. HENRY CJ, MCCAWE DL, BROCK KV, et al
Association between cancer chemotherapy and canine distemper virus, canine parvovirus, and rabies virus antibody titers in tumor-bearing dogs
J Am Vet Med Assoc., novembre 2001, **219**, 9, 1238-1241
20. KERZHERO Jérôme
Evaluation des protéines Midkine et Survivine surexprimées dans les cellules tumorales comme cibles de l'immunité cellulaire antitumorale
Th. D : Immunologie- Biotechnologie : Paris, Université Paris XI : avril 2009 ;
214p
21. KYRITSIS A P, SIOKA C et J S RAO
Viruses, gene therapy and stem cells for the treatment of human gliomas
Cancer Gene Ther., octobre 2009, **16**, 741-752
22. KUROKI M, SHIBAGACHI H, KINUGASA T, et al
Targeting of cancer gene therapy with antibodies or their gene against tumor-associated antigens
Gene Ther. Mol. Biol., 2005, **9**, 107-112
23. KYRITSIS A P , SIOKA C, RAO J S
Viruses, gene therapy and stem cells for the treatment of human glioma
Cancer Gene Ther., octobre 2009, **16**, 10, 741-752
24. LACAVE R, LARSEN CJ et ROBERT J
Cancérologie fondamentale
John Libbey Eurotext, Paris, 2005, 460p

25. LEE JJ, CHEN PB, YANG SH, et al
Effect of the VP3 gene of chicken anemia virus on canine mammary tumor cells
Am J Vet Res., avril 2007, **68**, 4, 411-422
26. LEMAY G.
Le réovirus de mammifères: un virus « orphelin » contre les cancers humains
Medecine/Sciences, décembre 2002, **18**, 1202-1206
27. NOTEBORN H M, DANEN-VAN-OORCHOT A A M, VAN-DER-EB A J
The apoptine gene of chicken anemia virus in the induction of apoptosis in human tumorigenic cells and in gene therapy of cancer
Gene Ther. Mol. Biol., mars 1998, **1**, 399-406
28. PERRICAUDET M, SCHLUMBERGER M, YEH P, et al
Adénovirus recombinants codant pour le transporteur spécifique de l'iode (NIS)
Brevet européen, 21 novembre 2007, **49**
29. POUJOL Laure
Les lymphomes malins canins : infiltrations médullaires et pronostic : Etude bibliographique et étude rétrospective menée sur 47 cas
Th. D, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2006, 81p
30. PUFF C, KRUEWIG C, IMBSCHWEILER I, et al
Influence of persistent canine distemper virus infection on expression of RECK, matrix-metalloproteinases and their inhibitors in a canine macrophage/monocytic tumour cell line (DH82)
Vet J., octobre 2009, **182**, 1, 100-107

31. SMITH BF, CURIEL DT, LE LP, RIVERA AA, et al
Infectivity enhancement for adenoviral transduction of canine osteosarcoma cells
Gene Ther., mars 2006, **13**, 5, 389-399
32. SMITH BF, CURIEL DT, TERNOVOI VV, et al
Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs
Cancer Biother Radiopharm., décembre 2006, **21**, 6, 601-606
33. SU C, CAO H, TAN S, HUANG Y, et al
Toxicology profiles of a novel p53-armed replication-competent oncolytic adenovirus in rodents, felids, and nonhuman primates
Toxicol Sci., novembre 2008, **106**, 1, 242-250
34. SUTTER S.E., CHEIN M.B., VON MESSLING V, et al
In vitro Canine Distemper Virus Infection of Canine Lymphoid Cells: A Prelude to Oncolytic Therapy for Lymphoma
Clinical Cancer Research, février 2005, **11**, 1579-1587
35. SZELECHOWSKI M, SAÏB A
Une nouvelle arme contre le cancer : bilan sur les virus oncolytiques
Virologie, juillet-août 2005, **9**, 261-271
36. TEODORO JG, HEILMAN DW, PARKER AE, et al
VP3 associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53
Genes Dev., 2004, **18**, 1952–1957

37. VÄHÄ-KOSKELA M, HEIKKILÄ J, HINKKANEN A
Oncolytic viruses in cancer therapy
Cancer Letters, 2007, **254**, 178-216
38. VAN KOOTEN CEES, BANCHEREAU J
Immune regulation by CD40-CD40-L interactions
<http://www.bioscience.org/1997/v2/d/kooten1/htmls/3.htm>
39. VAN REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM, BISHOP DHL et al
Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses, seventh report of the international comitee on taxonomy of viruses
Academic Press, San Diego, California, 2000
40. VON EULER H, SADEGHI A, CARLSSON B, et al
Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma
J Immunother., mai 2008, **31**, 4, 377-384
41. WELD KJ, MAYHER BE, ALLAY JA et al
Transrectal gene therapy of the prostate in the canine model
Cancer Gene Ther., février 2002, **9**, 2, 189-196
42. ZHANG Q, YU Y.A, WANG E et al
Eradication of Solid Human Breast Tumors in Nude Mice with an Intravenously Injected Light-Emitting Oncolytic Vaccinia Virus
Cancer Res, octobre 2007, **67**, 10038-10046

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle MORAND Sylvia
a été admis(e) sur concours en : 2004
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11 juin 2009
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

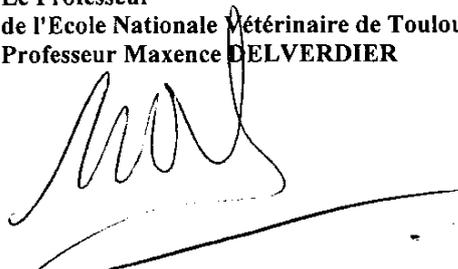
Je soussigné, Maxence DELVERDIER, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle MORAND Sylvia

intitulée :

« Virothérapie anticancéreuse chez les carnivores domestiques : actualités bibliographiques. »

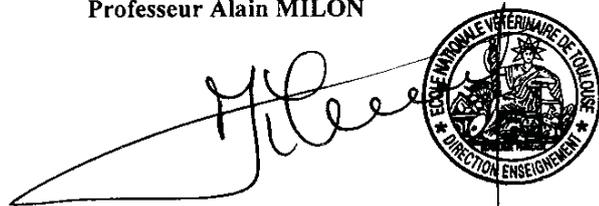
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Maxence DELVERDIER**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu le : 05 JUIL. 2010
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**

