

Université de Montréal

**THÉRAPIE GÉNIQUE DE CANCERS SPONTANÉS CHEZ LE CHIEN
IL-2 CANINE DÉLIVRÉE PAR DES RÉTROVECTEURS**

par

BIANCA MOREL

Département de pathologie et de microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Avril 2005

© Bianca Morel, 2005



SF
607
U54
2005
V.024

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**THÉRAPIE GÉNIQUE DE CANCERS SPONTANÉS CHEZ LE CHIEN
IL-2 CANINE DÉLIVRÉE PAR DES RÉTROVECTEURS**

présenté par
BIANCA MOREL

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Marcelo Gottschalk, président-rapporteur

Dr Daniel Martineau, directeur de recherche

Dr Jacques Galipeau, codirecteur de recherche

Dre Marilyn Dunn, codirectrice de recherche

Dr Rocky DiFruscia , membre du jury

RÉSUMÉ

Les modèles murins employés actuellement pour le développement de la thérapie du cancer comportent plusieurs désavantages : les rongeurs diffèrent des patients humains par leur masse corporelle, longévité, physiologie, homogénéité génétique, environnement et par la nature même des tumeurs expérimentales. En contraste, les chiens ressemblent aux patients humains sous tous ces rapports incluant l'incidence élevée de cancers spontanés. Notre objectif est de développer l'immunothérapie génique de cancers spontanés chez le chien.

Notre hypothèse est que des cellules ingénierées pour produire et relâcher localement l'IL-2 canine susciteront une réaction immunitaire *in vivo*. Pour démontrer cette hypothèse, nous explorons l'immunothérapie cellulaire par l'implantation de cellules cancéreuses irradiées ou de cellules stromales de la moelle osseuse dans l'environnement de la tumeur suite à leur transduction *in vitro*.

Un rétrovecteur bicistronique codant pour l'IL-2 canine et GFP (titre de 3×10^5 particules/mL déterminé par analyse de cytométrie de flux) a été développé et testé *in vitro* sur quatre lignées cellulaires tumorales canines (adénocarcinome mammaire, adénocarcinome de la prostate, carcinome spinocellulaire et tumeur ovarienne) et sur des cellules stromales de la moelle osseuse. Il a été démontré que chaque lignée transduite (efficacité de transduction de 30 à 61% selon la lignée, déterminée par GFP en analyse de cytométrie de flux) produit de l'IL-2 canine fonctionnelle en quantité suffisante pour activer des lymphocytes (de 15 à 1550 U / 10^6 cellules / 24hrs) *in vitro*.

Mots clés : chien, immunothérapie cellulaire, cancer, IL-2 canine, rétrovecteur, VSV-G.

ABSTRACT

The murine models currently used in cancer gene therapy present many differences with humans: their body weight, their life expectancy, their physiology, their genetic homogeneity, their environment and the experimental nature of their tumors. In contrast, dogs are like humans in many of these aspects and they also have a high frequency of spontaneous cancers. Our objective is to develop a genic immunotherapy of spontaneous cancer in dogs.

Our hypothesis is that modified cells that express and release locally dog IL-2 will provoke an immune response *in vivo*. To prove this hypothesis, we will investigate cellular immunotherapy by the introduction of irradiated cancer cells or bone marrow stroma cells in the tumor following *in vitro* transduction.

A bicistronic retroviral vector encoding for dog IL-2 and GFP (titer of 3×10^5 particles/mL analysed by flow cytometry) was developed and tested *in vitro* on four canine tumor cell lines (breast adenocarcinoma, prostate adenocarcinoma, spindle cell carcinoma, ovary tumor) and on canine bone marrow stromal cells. Each of these transduced cell lines (transduction efficacy of 30 to 61% analysed by flow cytometry) was shown to produce enough functional dog IL-2 to activate lymphocytes (15 to 1550 U / 10^6 cells / 24 hours) *in vitro*.

Key words: dog, IL-2, cellular immunotherapy, cancer, retroviral vector, VSV-G

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	7
1. Le cancer.....	8
1.1 Définition du cancer.....	8
1.2 L'immunité cellulaire cytotoxique et l'évasion des tumeurs.....	13
1.2.1 Immunité cellulaire cytotoxique.....	13
1.2.2 Dose d'antigènes (Ag) dans les organes lymphoïdes secondaires.....	21
1.2.3 Mécanismes d'évasion des cellules tumorales au système immunitaire.....	22
2. Thérapie génique du cancer.....	36
2.1 Définition.....	37
2.2 Les différentes voies expérimentées en thérapie génique du cancer.....	37
3. Immunothérapie génique et cellulaire du cancer.....	49
3.1 Définition de l'immunothérapie génique et/ou cellulaire du cancer.....	49

3.2 Immunothérapie génique.....	52
3.2.1 Définition.....	52
3.2.2 Méthodes d'insertion des gènes thérapeutiques	
dans les patients.....	52
3.2.2.1 ADN nu.....	53
3.2.2.2 Les molécules cationiques.....	53
3.2.2.3 Vecteurs viraux.....	58
3.2.3 Avantages et inconvénients de l'immunothérapie	
génique.....	73
3.3 Immunothérapie cellulaire.....	76
3.3.1 Définition.....	76
3.3.2 Types de cellules utilisées en thérapie cellulaire.....	76
3.3.2.1 Les cellules hétérologues.....	78
3.3.2.2 Les cellules autologues saines.....	79
3.3.2.3 Les cellules autologues tumorales	
inactivées.....	81
3.3.3 Les voies d'administration des cellules modifiées.....	83
3.3.4 Avantages et inconvénients de l'immunothérapie	
cellulaire.....	86
3.4 Les gènes utilisés en immunothérapie génique et cellulaire	
du cancer.....	87
3.4.1 Les antigènes associés aux tumeurs (AAT).....	88
3.4.2 Les superantigènes.....	92
3.4.3 Les molécules de co-stimulation et d'adhésion.....	93
3.4.4 Les interférons (IFN).....	96
3.4.5 Les interleukines (IL).....	97
3.4.6 Les facteurs stimulants de colonies (CSF)	104
4. L'IL-2 en immunothérapie protéique, génique et cellulaire du cancer	
chez l'humain et les modèles murins.....	106
4.1 L'immunothérapie protéique systémique à l'IL-2.....	106
4.2 L'immunothérapie locale à l'IL-2 (protéique, génique et	

cellulaire).....	112
4.2.1 Immunothérapie protéique locale du cancer à l'IL-2...	112
4.2.2 Immunothérapie génique locale du cancer à l'IL-2.....	116
4.2.3 Immunothérapie cellulaire locale du cancer à l'IL-2 ...	122
5. Les modèles animaux pour l'étude des cancers.....	129
6. L'IL-2 en immunothérapie protéique, génique et cellulaire du cancer chez les modèles canins.....	137
6.1 Immunothérapie protéique locale du cancer à l'IL-2	137
6.2 Immunothérapie génique locale du cancer à l'IL-2.....	140
6.3 Immunothérapie cellulaire locale du cancer à l'IL-2.....	143
Méthodologie.....	146
Article : « Efficient transduction of canine cells with canine IL-2 using a VSV G-pseudotyped oncovector».....	152
Discussion	182
Conclusion.....	194
Bibliographie.....	199

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les vecteurs viraux utilisés fréquemment en thérapie génique chez l'humain.....	60
Tableau II : Les différents antigènes tumoraux connus.....	89
Tableau III : Comparaison entre les souris, les chiens et les humains.....	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+).....	16
Figure 2 : Les étapes de l'immunité cellulaire cytotoxique.....	17
Figure 3 : Relation entre la réponse immunitaire et la quantité d'Ag menée aux organes lymphoïdes secondaires.....	23
Figure 4 : La structure complète du complexe TCR des lymphocytes T (CD4+ et CD8+).....	30
Figure 5 : Histogramme représentant le pourcentage des essais cliniques en thérapie génique utilisés dans différents domaines de la médecine humaine.....	38
Figure 6 : Les différentes voies explorées en thérapie génique du cancer chez l'humain.....	39
Figure 7 : La création de vecteur avec des lipides cationiques.....	57
Figure 8 : Histogramme des différents vecteurs viraux utilisés dans les protocoles de thérapie génique humaine.....	62
Figure 9 : Différence entre la liaison d'un Ag conventionnel et d'un superantigène à un TCR.....	94
Figure 10 : Les molécules de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes.....	95

Figure 11 : Rôle des interférons (IFN) dans l'immunité cytotoxique.....	98
Figure 12 : La structure des récepteurs d'IL-2 et IL-15.....	100
Figure 13 : Schéma de vue d'ensemble du projet « Immunothérapie génique de cancers spontanés canins par l'IL-2 délivrée par des rétrovecteurs».....	150

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAT	Antigènes Associés aux Tumeurs
AAV	Vecteur Adéno-Associé
Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
Ag	Antigène
AP2	Plasmide rétrovecteur utilisé dans mon projet (IL-2 canine)
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
CEA	Carcinoembryonic Antigen (Antigène Carcinoembryonique)
CAV-1	Adénovirus Canin de sérotype 1
CAV-2	Adénovirus Canin de sérotype 2
CD	Cytosine Désaminase
CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée
CMV	Cytomégalovirus
CSF	Facteur Stimulant de Colonies
cGM-CSF	Facteur Stimulant de Colonies de Monocytes et de Granulocytes canins
cIL-2	Interleukine 2 canine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CmPRV	Cellules murines Productrices de Rétrovecteurs
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTL	Lymphocyte T Cytolytique
DOPE	Diolelylphosphatidylethanolamine

FDA	Food and Drug Administration (organisme des É-U)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance des Fibroblastes)
G	Gramme
G-CSF	Facteurs Stimulants des Colonies de Granulocytes
GCV	Ganciclovir
GCV-p	Ganciclovir phosphorylé
GFP	Green Fluorescent Protein (Protéine fluorescente verte de méduse)
GM-CSF	Facteur Stimulant des Colonies de Monocytes et de Granulocytes
GPI	Phospholipide Glycoinositol
Gy	Gray
hGM-CSF	Facteur Stimulant des Colonies de Monocytes et de Granulocytes humains
hIL-2	Interleukine 2 humaine
HPV	Virus Papilloma Humain
HSV	Virus Herpès Simplex
HSV-TK	Thymidine Kinase du Virus l'Herpès Simplex
IFN	Interféron
IFN α	Interféron alpha
IFN α_{2a}	Interféron alpha 2a
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IL-1 α	Interleukine 1 alpha
IL-10	Interleukine 10
IL-12	Interleukine 12
IL-15	Interleukine 15
IL-18	Interleukine 18
IL-2	Interleukine 2
IL-2h	Interleukine 2 humaine

IL-2rh	Interleukine 2 recombinante humaine
IU	Unité Internationale
Jak1	Janus kinase 1
Jak3	Janus kinase 3
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogramme
LAK	Cellules « Lymphokin Activated Killer »
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LPD	Complexes Liposome / Protamine / ADN
LTR	Long Terminal Repeat (séquence du génome endogène des rétrovirus)
M-CSF	Facteur Stimulant des Colonies de Monocytes
mGM-CSF	Facteur Stimulant des Colonies de Monocytes et de Granulocytes murins
mIL-2	Interleukine 2 murine
MMP	Métalloprotéinase de la Matrice
MOI	Multiplicity Of Infection (multiple d'infection)
Mo MLV	Moloney Murine Leukemia Virus (virus Moloney de la leucémie murine)
MPSV	Myeloproliferative Sarcoma Virus (virus du sarcome myéloprolifératif)
MS	Microsphères
MVA	Virus Vaccinia Ankara Modifié
NK	Cellules « Natural Killer »
NK-T	Cellules « Natural Killer » portant un TCR
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
OTC	Ornithine Transcarbamylase
PA	Activateur du Plasminogène
pBléo	Plasmide codant pour la résistance à la zéomycine
pCanIL2-GFP	Plasmide rétrovecteur codant pour l'IL-2 canine
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne

PEI	Polyéthylénimine
PGE2	Prostaglandine E2
pGEM-T	Vecteur navette (Promega)
PGK	Kinase Phosphoglycérate
PLL	Poly (L-lysine)
PMN	Cellules Polymorphonucléaires
RCR	Rétrovecteurs Compétents dans la Réplication
SCC	Spindle Cell Carcinoma (Carcinome spinocellulaire)
SCID-X1	Immunodéficiences sévères combinées liées au chromosome X
SEA	Entérotoxine A de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEB	Entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
TCGF	Facteur Stimulant des Cellules T
TCR	T Cell Receptor (Récepteur des lymphocytes T)
TGFβ	Tumor Growth Factor beta (Facteur de croissance des tumeurs bêta)
TIL	Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs
TK	Thymidine Kinase
TNFα	Facteur Nécrosant de Tumeur alpha
TSA	Antigènes Spécifiques aux Tumeurs
U	Unités
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VEGI	Vascular Endothelial Growth Inhibitor factor (Facteur inhibiteur de la croissance de l'endothélium vasculaire)
VSV-G	Protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculeuse
293GPG	Lignée cellulaire embryonnaire humaine de rein contenant les gènes <i>gag</i> , <i>pol</i> et <i>VSV-G</i>

5-FC	5-Fluorocytosine
5-FU	5-Fluorouracile
β -gal	Bêta-galactosidase
μ g	Microgramme

*Aux hommes de ma vie
Sans qui tout ça n'aurait jamais existé...*

Yannick Courty

Nicolas et Roby

Bianca

REMERCIEMENTS

Pour la chaleur, la beauté, le bonheur et le bien-être incomparable. Pour la sérénité.
Pour ton amour et la place à tes côtés... merci Yannick

Pour ton écoute et ton soutien. Pour ta tendresse et ta présence. Pour l'aide précieuse
que tu m'as apportée sans hésiter... merci Nicolas

Pour m'avoir donné la persévérance et la fierté. Pour la passion. Pour les rêves que tu
m'as faits vivre et pour tout ce que je ne pourrai jamais oublier ... merci Roby

Pour le modèle d'extrême vouloir et de pouvoir, pour l'énergie que j'ai toujours
ressentie en toi et pour la confiance que tu n'as jamais cessé de porter en moi...merci
Simon

Pour m'avoir endurée sous votre toit si longtemps, pour votre patience envers mon
tempérament pas toujours rose et pour l'amour que vous me portez...merci papa &
maman, merci Alex & Priscilla

Pour la complicité qui est née entre nous, pour l'aide que vous m'avez apportée sans
jamais compter, pour vos talents de chanteurs, pour le soutien moral lorsqu'on se
retrouvait en tête à tête entre étudiants à travailler comme des acharnés... merci
Hélène, Arnaud et François

Pour vos mille et un petits conseils, pour vos sourires et votre accueil à bras
ouverts...merci Jacques, John, Laurence, Sébastien, Nicoletta, Diana et les autres.
Sans vous, la thérapie génique n'aurait jamais eu la couleur que je lui donne
aujourd'hui.

Pour votre excellence dans le domaine clinique, pour votre disponibilité chaque fois que je criais « à l'aide », pour vos sourires et votre humour. Tout simplement pour m'avoir gardée sous votre aile, là où je regagnais mon énergie... merci Marilyn Dunn, Bertrand Lussier, Éric Troncy, Juan Hernandez, Louis Huneault Martel

Pour les innombrables connaissances que tu possèdes et tu m'as inculquées, pour avoir vu en moi un médecin vétérinaire capable de relever un tel défi et pour y avoir mis le temps et l'effort nécessaire afin que je le réussisse avec brio... merci Daniel

Je remercie aussi la Faculté de médecine vétérinaire pour la bourse du Fonds du Centenaire qui m'a été remise pendant mes études supérieures.

INTRODUCTION

Le cancer occupe une place importante dans la recherche tant au niveau des moyens de diagnostic précoce, qu'au niveau des facteurs prédisposant à son apparition, de la pharmacologie et des autres modalités de traitement. Cette importance découle en partie du fait que le cancer constitue la deuxième cause la plus importante de décès chez l'humain tout juste derrière les maladies cardio-vasculaires et que son incidence ne cesse d'augmenter d'année en année en Amérique du Nord (Cui Z, 2004).

Plusieurs modalités de traitement pour le cancer existent de nos jours. Malheureusement, rares sont celles donnant un rendement satisfaisant pour le traitement de différents types de cancers. Chacune semble être modérément efficace pour quelques types particuliers de cancers. Parmi celles-ci, nous retrouvons la chimiothérapie, la radiothérapie, la chirurgie et l'immunothérapie. Depuis quelques années, un nouveau domaine est exploré pour développer des stratégies thérapeutiques pour le traitement des cancers humains : le génie génétique.

Les premières études en génie génétique furent réalisées sur des modèles murins et leurs résultats se sont avérés intéressants. Malheureusement, lorsque les chercheurs ont transposé ces nouvelles stratégies de traitement du cancer chez l'humain, peu d'entre elles se sont avérées aussi efficaces (Stewart AK, 1999) (Stewart AK, 1998). Depuis quelque temps, les chercheurs semblent attribuer cette différence dans l'efficacité des

traitements à la divergence évolutive retrouvée entre les espèces traitées. En effet, de nombreuses différences existent entre les modèles murins et l'humain (Vail DM, 2000) (Knapp DW, 1997). Or, les thérapies géniques développées et testées dans les modèles murins sont subséquemment utilisées pour traiter le cancer chez les humains. Les chercheurs évaluent donc la possibilité de tester les stratégies de thérapie génique dans des modèles animaux plus semblables à l'humain, soit les primates non-humains, les chats et les chiens. Le chien est maintenant considéré comme une espèce représentative de l'humain du point de vue de la biologie de plusieurs types de cancers, cancers qu'il développe spontanément comme l'humain. Le chien est aussi une espèce plus facile à étudier que les primates non-humains en laboratoire (Knapp DW, 1997).

La thérapie génique offre de nombreuses voies de traitement pour le cancer. Parmi elles, nous retrouvons les thérapies anti-angiogéniques, les thérapies dites suicides, les thérapies utilisant des suppresseurs de tumeur, les oncogènes antisens, les thérapies utilisant des gènes de résistance à de multiples médicaments ainsi que les immunothérapies géniques. Le trait commun entre toutes ces voies de traitement consiste à insérer un gène synthétique thérapeutique à l'intérieur du patient ou à l'intérieur des cellules extraites du patient (procédé effectué en laboratoire suivi de la réimplantation des cellules modifiées dans le patient à être traité). La thérapie génique permet donc une production et une libération continues et soutenues de la

protéine thérapeutique dans le microenvironnement des cellules tumorales. Puisque le patient produit lui-même son médicament, les coûts liés à la fabrication et à l'administration du médicament sont diminués. Les différentes voies de traitement du cancer en thérapie génique sont souvent combinées entre elles ou combinées avec d'autres modalités thérapeutiques (telles que la radiothérapie ou la chirurgie) afin de profiter de la synergie qui existe lors de telles combinaisons. Les deux voies de thérapies géniques les plus fréquemment utilisés sont les thérapies dites suicides et l'immunothérapie génique (Gunji Y, 2000).

L'immunothérapie génique utilise dans plus de 60% de ses protocoles le gène de l'IL-2 (Jantschkeff P, 1999). L'IL-2 est reconnu comme étant un facteur central dans l'immunité cellulaire cytotoxique, immunité nécessaire pour détruire les cellules cancéreuses. L'IL-2 a d'abord été utilisée dans plusieurs protocoles d'immunothérapie où la cytokine synthétique était injectée directement dans la circulation sanguine de patients humains atteints de carcinome rénal ou de mélanome. Quoique cette stratégie de traitement ait provoqué la régression complète de quelques masses tumorales, elle fut vite mise de côté à cause d'une importante toxicité systémique associée à son administration intraveineuse à de fortes doses (Rosenberg SA, 2001). Suite à ces événements, d'autres chercheurs ont essayé une nouvelle stratégie d'immunothérapie en administrant par la voie intraveineuse des doses plus faibles d'IL-2 (Mitchell MS, 2003). Encore une fois, des cas de régression

complète de carcinome rénal ont été obtenus, mais dans une proportion beaucoup plus faible que lorsque la dose plus élevée était administrée. Notons qu'aucune toxicité systémique ne fut observée lorsque des bas dosages d'IL-2 étaient administrés par la voie intraveineuse. Par contre, ces dosages plus bas n'avaient aucune efficacité lors du traitement de mélanome.

Les chercheurs savaient maintenant que l'IL-2 était une molécule fort prometteuse dans la thérapie du cancer puisqu'elle était efficace et qu'elle pourrait être utilisée dans le traitement de n'importe quel type de cancer. Ils ont donc cherché le moyen de localiser des doses élevées d'IL-2 dans l'environnement des masses tumorales de façon à activer le système immunitaire contre les cellules cancéreuses tout en évitant les effets secondaires néfastes rencontrés lorsque de fortes doses d'IL-2 se retrouvent dans la circulation sanguine. Depuis lors, de nombreuses études en immunothérapie génique testent le potentiel de stratégies thérapeutiques permettant une concentration élevée d'IL-2 dans l'environnement des tumeurs. Certaines équipes testent la délivrance du gène de l'IL-2 en injectant directement l'ADN dans les masses tumorales tandis que d'autres testent l'utilisation de liposomes ou de différents vecteurs viraux codant pour l'IL-2. De plus, certains d'entre eux testent l'administration de cellules (autologues ou hétérologues) modifiées *in vitro* pour exprimer l'IL-2 puis

réimplantées dans l'environnement des masses tumorales des patients cancéreux.

La majorité des protocoles d'immunothérapie génique du cancer testent l'administration du gène de l'IL-2 murine ou humaine dans des souris puis chez les humains. Ayant pris conscience de la divergence entre les modèles murins et les humains, mon projet consistait à étudier l'impact de l'IL-2 canine délivrée par des rétrovecteurs dans différentes lignées cellulaires canines saines et tumorales. Dans mon projet, des rétrovecteurs pseudotypés avec VSV-G et codant pour l'IL-2 canine ont transduit efficacement quatre lignées tumorales canines ainsi que des cellules stromales de la moelle osseuse de chien (race Beagle). Ces différentes lignées cellulaires transduites ont exprimé le gène de l'IL-2 canine et ont relâché la protéine IL-2 canine dans leur environnement *in vitro*. Finalement, l'IL-2 canine produite par les cellules transduites a été démontrée fonctionnelle *in vitro*.

**RECENSION DE LA
LITTÉRATURE**

1. Le cancer

L'urgence de trouver une thérapie adéquate contre le cancer vient du fait que l'incidence du cancer dans la population humaine ne cesse de croître. Le cancer se classe au premier rang des conditions pathologiques les plus meurtrières chez les patients américains (États-Unis) âgés de 46 à 75 ans et se déplace au deuxième rang, juste derrière les maladies cardiaques, chez ceux de 76 ans et plus (Cui Z, 2004). En ordre décroissant de fréquence, les cancers vus chez l'homme en Amérique du Nord se classent ainsi : cancer de la prostate (33%), cancer du poumon (14%) et cancer du colon (11%) tandis que dans le même ordre, les cancers vus chez la femme se classent plutôt comme suit : cancer du sein (32%), cancer du poumon (12%) et cancer du colon (11%). Par ailleurs, le cancer du poumon demeure celui tuant le plus d'humains, hommes et femmes confondus (sites internet de Santé Canada : statistiques de 2002 & American cancer society : statistiques de 2003). Avec l'avènement de la thérapie génique du cancer, il devient alors possible de penser qu'un jour un traitement efficace éliminant chacune des cellules anormales constituant les cancers primaires et leurs métastases sera mis au point et permettra la guérison complète des animaux atteints de cancer.

1.1 Définition du cancer

Le cancer se définit comme une maladie génétique qui découle d'une accumulation successive d'altérations dans le génome d'une cellule, altérations conférant un avantage dans la multiplication de cette cellule comparativement à la multiplication des cellules saines du même type. La multiplication de cette cellule transformée par une première altération génétique, ainsi que l'apparition d'altérations subséquentes dans la progéniture de cette cellule mère mènent à la formation d'une masse tumorale renfermant une population hétérogène de cellules cancéreuses. Cette masse tumorale est génétiquement instable et l'émergence constante de cellules différentes, de par les altérations incessantes, permet la survie des cellules transformées dans un animal au système immunitaire sain et fonctionnel. Les altérations génétiques sont des modifications du génome allant de la simple mutation ponctuelle jusqu'à des aberrations (délétion, fusion, translocation, etc.) au niveau des chromosomes. Ces altérations acquises par les cellules tumorales leur permettent de se diviser rapidement et d'échapper au système immunitaire en se modifiant plus rapidement que le temps requis par le système immunitaire pour mettre en place une défense adéquate (Whiteside TL, 2003). De façon plus spécifique, ces altérations permettent aux cellules tumorales de produire leurs propres signaux de croissance, de devenir insensibles aux signaux d'inhibition de la croissance, d'échapper à l'apoptose, d'acquérir un potentiel illimité de multiplication, de promouvoir l'angiogenèse dans leur environnement et finalement d'envahir

les tissus adjacents et ceux distants par le biais de métastases (Hanahan D, 2000).

Les tumeurs sont divisées en deux catégories d'après leur comportement biologiques et leurs caractéristiques phénotypiques. La première catégorie regroupe les tumeurs bénignes, c'est-à-dire celles composées de cellules différenciées et ayant une croissance généralement lente. Les tumeurs bénignes croissent par expansion et n'ont pas tendance à infiltrer les tissus adjacents ou éloignés. Ces tumeurs ont souvent un bon pronostic. La deuxième catégorie regroupe les tumeurs malignes aussi appelées « cancers ». Les tumeurs malignes sont composées de cellules de phénotypes hétérogènes, allant de cellules pleinement différenciées à des cellules souches ou embryonnaires. Ces tumeurs croissent par infiltration des tissus adjacents et peuvent même s'établir dans des organes distants du site de la masse tumorale primaire. Le pronostic des tumeurs malignes est souvent mauvais et les récives après traitement sont fréquentes.

Les métastases sont responsables de 90% des mortalités reliées aux cancers chez les humains. Elles sont constituées de cellules tumorales au caractère encore plus agressif que celles constituant la masse tumorale primaire qui possèdent le pouvoir de se détacher de cette masse tumorale primaire, d'infiltrer la circulation sanguine et/ou lymphatique, de se répandre à travers le corps grâce à ces circulations, de quitter ces circulations afin de

prendre racine dans des organes distants du site primaire et survivre dans des microenvironnements différents (organes ou cavités naturelles) de leur environnement primaire (Hanahan D, 2000).

Le seul traitement efficace du cancer consiste alors à éliminer chacune de ces cellules cancéreuses ayant cumulé mutations par-dessus mutations, et ce, tant au site primaire de la tumeur qu'au niveau des métastases. Or, aucun traitement développé jusqu'à présent ne remplit une telle fonction.

Une approche thérapeutique très exploitée se nomme chimiothérapie et consiste en l'administration de composés chimiques très toxiques pour les cellules en division rapide. Ces composés chimiques sont administrés à des doses élevées pouvant être tolérées par l'animal les recevant mais amenant souvent des effets secondaires sévères. En effet, les doses administrées, en plus de tuer les cellules cancéreuses, tuent les cellules saines soumises à une division rapide telles que les cellules constituant l'épithélium intestinal ainsi que les cellules souches du système hématopoïétique. Des signes cliniques de diarrhée, vomissement, neutropénie, thrombocytopénie et éventuellement d'anémie sont souvent observés chez les patients traités par chimiothérapie, signes cliniques accentués si le traitement est effectué chez des patients âgés. Or, plus de 50% des tumeurs retrouvées chez l'humain se développent chez des patients âgés de 65 ans ou plus. Pour pallier à ces effets secondaires nocifs, des traitements de soutien doivent être institués en

même temps que la chimiothérapie tels que l'administration de facteur stimulant des colonies (GM-CSF ou G-CSF) ainsi que de l'érythropoïétine (Wildiers H, 2003) (Sharma R, 2005). De plus, il arrive souvent que les cellules cancéreuses deviennent résistantes aux composés chimiques utilisés en chimiothérapie en acquérant de nouvelles mutations. Suite à la sélection et à la multiplication de ces nouvelles cellules tumorales résistantes dans l'animal, les tumeurs deviennent réfractaires au composé chimique et un autre composé chimique doit alors être utilisé en chimiothérapie ou d'autres alternatives de traitements doivent être prises en considération (Bergman PJ, 2003).

Parmi ces autres alternatives se retrouvent : la chirurgie, la radiothérapie et la thérapie génique. Les deux premiers types de traitements nécessitent que la tumeur soit une masse définie pour être efficaces. Ils sont très peu efficaces contre les métastases, ces petites masses disséminées à travers les organes de l'animal.

Par contre, la thérapie génique constitue une voie prometteuse dans la course contre le cancer. La définition de la thérapie génique, ses différentes stratégies ainsi que ses voies d'administration seront vus plus longuement dans les pages qui suivent. Mentionnons ici seulement que la thérapie génique du cancer est une voie thérapeutique nous permettant de cibler les cellules cancéreuses en localisant le traitement dans l'environnement de

celles-ci et, souvent, de stimuler une réponse immunitaire adéquate permettant la destruction des métastases tout en laissant intactes les cellules saines de l'animal. Ce traitement permet donc d'éliminer bon nombre des cellules tumorales tout en minimisant les effets secondaires néfastes souvent rencontrés avec les autres types de thérapies mises à l'essai plusieurs années avant la thérapie génique.

1.2 L'immunité cellulaire cytotoxique et l'évasion des tumeurs

1.2.1 Immunité cellulaire cytotoxique

L'immunité sollicitée dans la lutte contre le cancer se nomme immunité cellulaire cytotoxique. C'est elle qui veille à produire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (effecteurs cytolytiques) pouvant détruire les cellules tumorales. Parmi les cellules participant à l'immunité cellulaire cytotoxique se retrouvent les cellules présentatrices d'antigène (CPA), les lymphocytes T auxiliaires de sous-type 1 (Th1), les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et les effecteurs de l'immunité innée soit les cellules Natural Killer (NK), les macrophages et les neutrophiles.

Les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B sont les CPA professionnelles. Les cellules dendritiques (DC) sont les CPA les plus efficaces du point de vue du traitement et de la présentation des antigènes (Ag). De façon simplifiée, nous pouvons considérer que les autres

CPA possèdent une fonction primaire autre que la présentation des Ag puisque les lymphocytes B ont comme fonction première de produire des anticorps (Ac) tandis que les macrophages ont comme fonction première de détruire les microorganismes (Tizard IR, 2000).

Les DC périphériques sont majoritairement immatures et possèdent une grande capacité d'endocytose des Ag. Suite à leur stimulation par les produits microbiens et/ou les cytokines pro-inflammatoires, les DC deviennent matures. Elles perdent alors une grande partie de leur capacité d'endocytose et augmentent leur capacité de traitement des Ag ainsi que l'expression de molécules de surface servant à communiquer avec les autres cellules du système immunitaire (complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), molécules de co-stimulation et molécules d'adhésion). De plus, les DC matures quittent la périphérie et se dirigent vers les nœuds lymphatiques périphériques où se retrouvent les lymphocytes B et T afin de stimuler les lymphocytes T et induire la réponse immunitaire primaire (Lundqvist A, 2002).

Les Th1 sont un sous-type de lymphocytes T auxiliaires (CD4+). Ils expriment à leur surface la molécule CD4+ reconnaissant le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CHM II) porté par les CPA. Les Th1 dirigent la réponse immunitaire vers un profil cellulaire en sécrétant des cytokines essentielles pour ce type d'immunité (IL-2, IFN γ , TNF α). Le deuxième sous-type de lymphocytes auxiliaires (Th2) expriment lui aussi la

molécule CD4+ à sa surface mais dirige plutôt la réponse immunitaire vers un profil humoral en sécrétant les cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) (figure 1) (Tizard IR, 2000).

Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) sont des lymphocytes T exprimant la molécule CD8+ à leur surface, une molécule reconnaissant le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I) porté par les CPA ainsi que par toute cellule constituant un animal. Une fois activés, les lymphocytes T cytotoxiques se différencient en lymphocytes T cytolytiques (CTL) capables de détruire les cellules qu'ils reconnaissent. Ce processus de reconnaissance est spécifique au récepteur TCR que les CTL portent : toute cellule reconnue par le TCR d'un CTL est détruite tandis que les cellules qui ne sont pas reconnues par le TCR sont laissées intactes (Tizard IR, 2000).

Voici les différentes étapes constituant l'immunité cellulaire cytotoxique (chaque étape est représentée dans la figure 2 par les chiffres encadrés) (Ribas A, 2000) (Tizard IR, 2000).

1. Interaction entre un lymphocyte T auxiliaire sous-type 1 (Th1) et une cellule présentatrice d'antigène (CPA) : Les Ag tumoraux doivent être traités par les CPA (surtout les cellules dendritiques) et présentés aux Th1 sous forme de peptide porté par le CMH II. L'interaction entre le récepteur TCR du Th1 et le

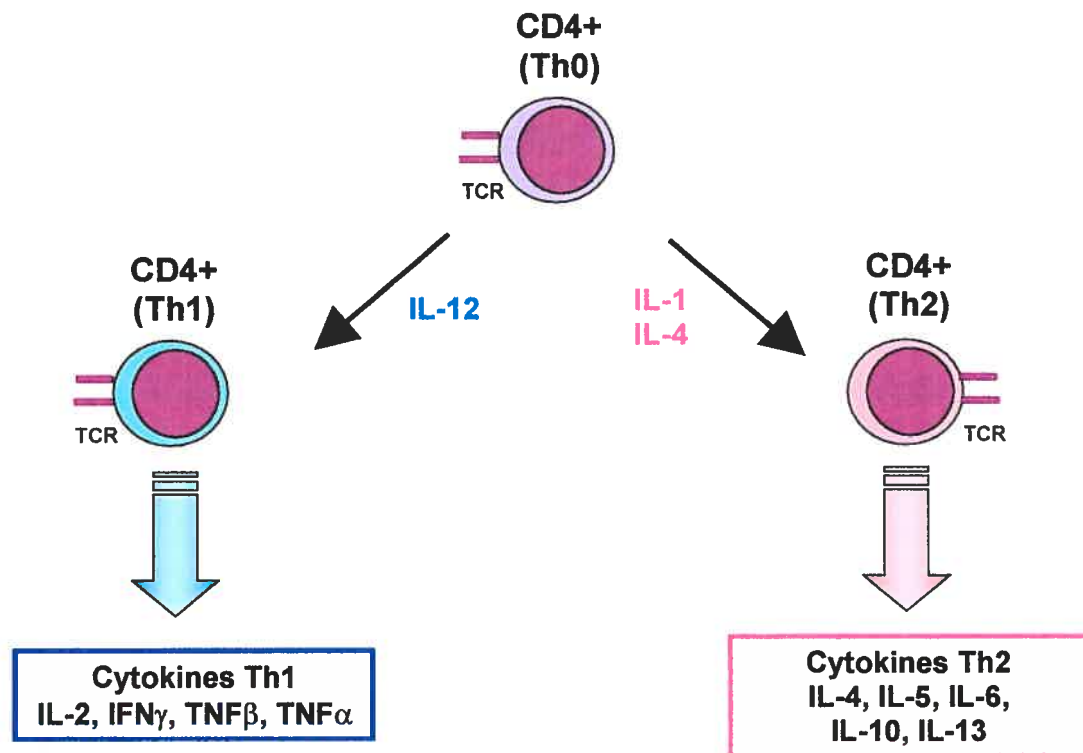


Figure 1. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+). Les lymphocytes T auxiliaires portent plusieurs molécules à leur surface dont le récepteur (TCR) spécifique à un Ag et la molécule CD4+ reconnaissant les CHM II à la surface des CPA. Les lymphocytes Th0 sont les précurseurs des sous-types Th1 et Th2. Les Th0 se différencient en un des deux sous-types selon les cytokines auxquels ils sont exposés. L'IL-12 provoque la différenciation du Th0 en Th1 tandis que l'IL-1 et l'IL-4 provoquent la différenciation du Th0 en Th2. Les lymphocytes auxiliaires Th1 sont impliqués dans l'immunité cellulaire et produisent les cytokines dites de type Th1, soit l'IL-2, l'IFN γ , le TNF α et le TNF β . Les lymphocytes auxiliaires Th2 sont impliqués dans l'immunité humorale et produisent les cytokines dites de type Th2, soit l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 (Tizard IR, 2000).

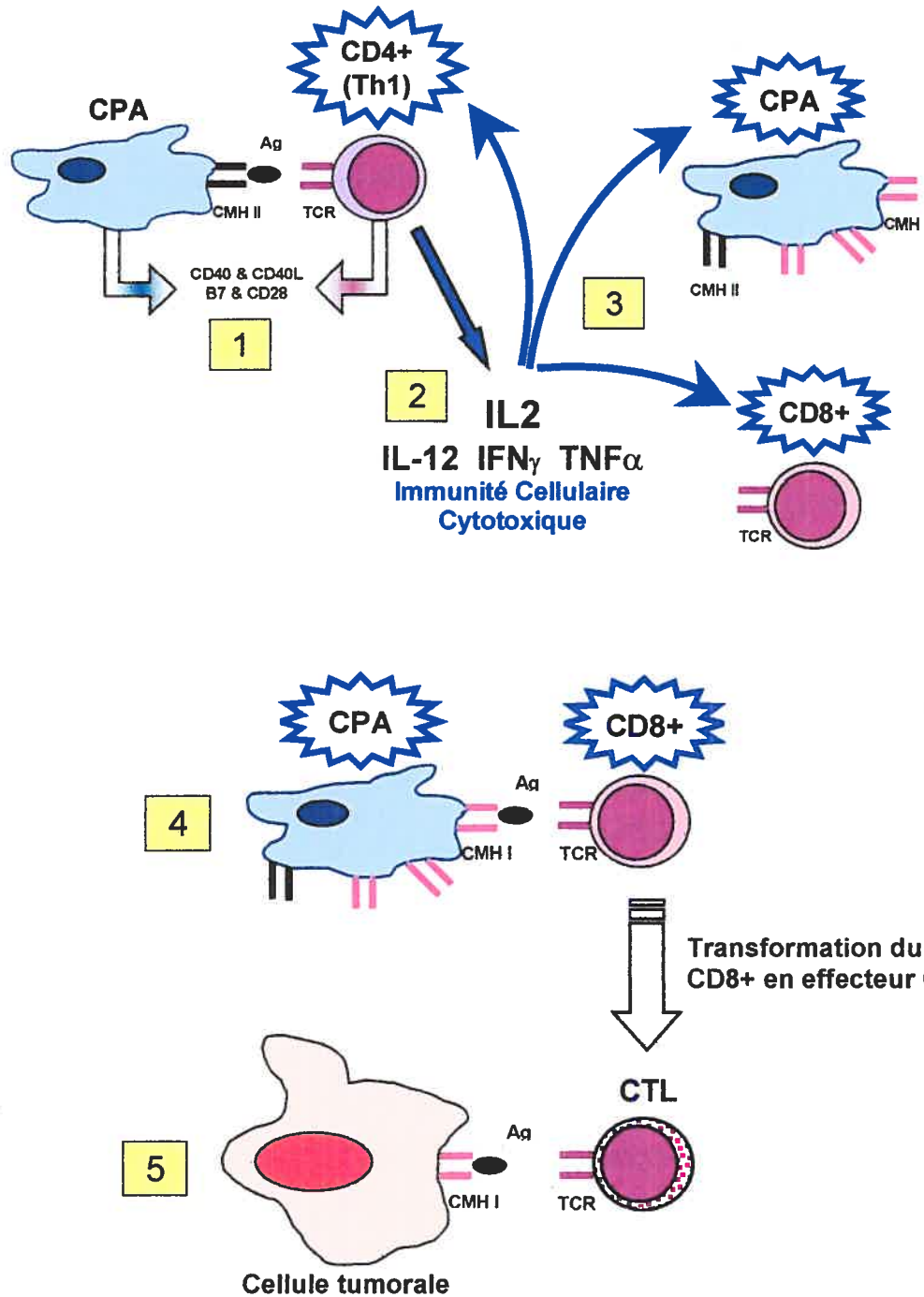


Figure 2. Les étapes de l'immunité cellulaire cytotoxique. 1) Interaction entre une CPA et un lymphocyte T auxiliaire 2) Production des cytokines de type Th1 par le lymphocyte T auxiliaire stimulé 3) Activation des CPA, lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) par les cytokines de type Th1 4) Interaction entre une CPA et un lymphocyte T cytotoxique activés 5) Interaction entre un CTL et une cellule tumorale.

complexe CMH II/peptide du CPA est essentielle pour le développement, l'activation, la différenciation et la survie des lymphocytes T (De Visser KE, 2003). En plus de l'interaction entre le TCR et le complexe CMH II/peptide, d'autres liens doivent se créer entre les Th1 et les CPA via les molécules de co-stimulation et d'adhésion (CD28 et B7-1, B7-2, LFA-1 et ICAM-1, CD40L et CD40, etc.)

2. Production des cytokines de type Th1 : Suite à ces multiples contacts, le lymphocyte Th1 activé produit différentes cytokines qui sont relâchées dans son microenvironnement. Selon le concept de l'immunité cellulaire cytotoxique, les cytokines produites sont l'IL-2, l'IFN γ et le TNF α , soit des cytokines de la réponse dite de type Th1 (par opposition aux cytokines de type Th2 qui stimulent une réponse immunitaire humorale). D'autres cytokines sont incluses dans le groupe Th1 mais elles ne sont pas produites par les lymphocytes Th1 telles que l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, etc.
3. Activation des lymphocytes et CPA : Les cytokines alors relâchées dans l'environnement (surtout l'IL-2) mènent à l'activation et à la prolifération des différents lymphocytes auxiliaires (Th1) et cytotoxiques (CD8+) ainsi que l'activation des

CPA. Les Th1 activés secrètent les cytokines de type Th1 et les CPA activés augmentent leur expression de CMH II et CMH I à leur surface, augmentent le traitement et la présentation des antigènes tumoraux sous forme de peptide ainsi que leur production de cytokines. De plus, l'IL-2 permet d'activer certaines cellules de l'immunité innée (soit les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK et celles NK-T) (Jackaman C, 2003).

4. Interaction entre un lymphocyte cytotoxique (CD8+) et une CPA :
Dans un second temps, les protéines tumorales traitées par les CPA doivent aussi être présentées aux CD8+ sous forme de peptide porté, cette fois-ci, par le CMH I à la surface du CPA. De plus, les liens au niveau des molécules de co-stimulation et d'adhésion requis entre les CPA et les Th1 sont aussi requis entre les CPA et les CD8+ sinon s'ensuit l'anergie des CD8+. Suite à ces contacts et sous l'influence de l'IL-2 dans leur environnement, les CD8+ activés se différencient en lymphocytes T cytolytiques (CTL) et ces CTL deviennent aptes à reconnaître les antigènes à la surface des cellules tumorales et à procéder à la destruction des cellules tumorales via différents mécanismes. Ces mécanismes permettant la cytotoxicité sont augmentés grâce à la présence de l'IL-2 dans l'environnement des effecteurs.

5. Interaction entre les effecteurs cytolytiques (CTL, LAK, NK et NK-T) et une cellule tumorale: Suit la mort de la cellule tumorale par des mécanismes propres aux CTL impliquant des molécules telles que FasL, la granzyme B et les perforines (De Visser KE, 2003). Par contre, si les cellules tumorales ne portent pas de CMH I à leur surface, les CTL sont incapables de les reconnaître et de procéder à leur destruction. Les cellules NK entrent alors en jeu et détruisent ces cellules tumorales ne portant pas de CMH I à sa surface (les cellules NK sont surtout impliquées dans la destruction des cellules infectées par des virus et des cellules tumorales ne portant pas de CMH I à leur surface). Par ailleurs, une étude suggère que les CTL peuvent aussi mener à une diminution de la vascularisation intra-tumorale en détruisant les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux (Jackaman C, 2003).

Toutes ces étapes de l'immunité cellulaire cytotoxique s'effectuent à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires (rate et nœuds lymphatiques) excepté la prise en charge de l'Ag tumoral par la CPA immature et la destruction de la cellule tumorale par les effecteurs cytolytiques. Donc, une quantité suffisante d'antigènes doit être amenée dans ces organes lymphoïdes secondaires par les CPA périphériques en contact avec les tumeurs pour qu'une réponse immunitaire cytotoxique efficace soit montée.

D'autres volets de l'immunité antitumorale impliquent l'immunité innée (cellules NK, LAK, NK-T, macrophages et les neutrophiles) et l'immunité humorale (production d'Ac contre les épitopes immunodominants des antigènes tumoraux), volets qui sont plus rarement pointés du doigt dans l'échec du système immunitaire à combattre les tumeurs (Dranoff G, 2003) (Smyth MJ, 2002) (Whiteside TL, 2003) (Schmitz G, 2003) (Cui Z, 2004).

1.2.2 Dose d'antigènes (Ag) dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques et rate) sont essentiels pour la mise en place d'une réponse immunitaire cytotoxique efficace puisqu'ils contiennent un rapport adéquat de cellules immunitaires fournissant les signaux de co-stimulation (B7-1, B7-2, CD40L, CD70, etc.) et les facteurs solubles de l'immunité cytotoxique (IL-2, IL-12, IL-18, IFN γ , TNF α , etc.). Les antigènes tumoraux doivent donc être transportés au niveau de ces organes lymphoïdes secondaires par les CPA (soit les cellules dendritiques, les macrophages activés et les lymphocytes B) pour que les lymphocytes T cytotoxiques soient stimulés et puissent par la suite quitter les organes lymphoïdes secondaires pour se diriger en périphérie où se retrouvent les cellules tumorales à éliminer.

Une faible dose d'antigènes tumoraux portée dans les organes lymphoïdes secondaires n'est pas suffisante pour induire une réponse

cytotoxique et les cellules tumorales restent alors ignorées par le système immunitaire (figure 3). Par contre, une dose excessive d'antigènes tumoraux amenée de façon continue à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires induit un mécanisme de tolérance immunitaire nommé épuisement, mécanisme empêchant aussi la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. Finalement, une dose moyenne d'antigènes tumoraux portée aux organes lymphoïdes secondaires durant une période de temps adéquate induit une réponse cytotoxique spécifique à ces antigènes, soit l'induction de CTL spécifique, leur migration hors des organes lymphoïdes secondaires, leur dissémination dans le corps de l'animal via les réseaux lymphatiques et finalement l'atteinte du site où se retrouvent les cellules tumorales à éliminer. (Ochsenbein AF, 2002) (Kwak H, 2003)

1.2.3 Mécanismes d'évasion des cellules tumorales au système immunitaire

Les tumeurs apparaissent et se développent souvent malgré la présence d'un système immunitaire actif et efficace dans le patient. Par exemple, une équipe de chercheurs a étudié 60 cancers du sein chez des femmes et ont conclu que chacun d'eux était infiltré par des lymphocytes T. La proportion de lymphocytes T auxiliaires (CD4+) comparativement aux lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) variait selon le degré d'infiltration des tumeurs. En effet, plus l'infiltration retrouvée dans les tumeurs était dense, plus la proportion de lymphocytes T cytotoxiques augmentait. De plus, ces

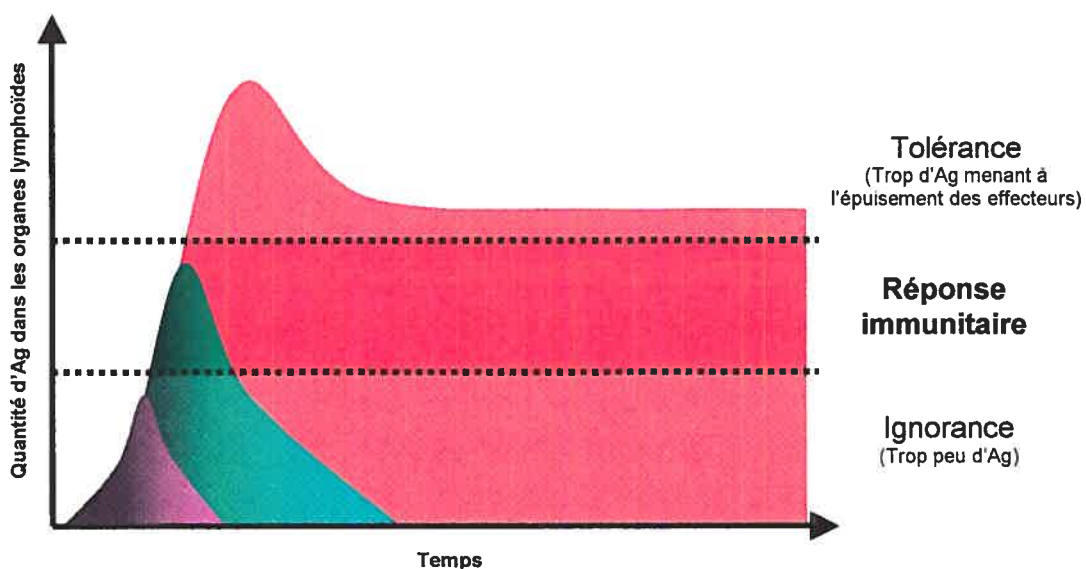


Figure 3. Relation entre la réponse immunitaire et la quantité d'Ag menée aux organes lymphoïdes secondaires. Si une quantité trop faible d'Ag est menée aux organes lymphoïdes secondaires, aucune réponse immunitaire n'est montée et l'organisme à être éliminé reste ignoré. Par contre, si une trop grande quantité d'Ag est menée en ces organes, un épuisement des effecteurs a lieu et ceux-ci sont alors inaptes à détruire l'organisme. Une quantité adéquate d'Ag doit donc être menée pendant une période minimale aux organes lymphoïdes secondaires pour qu'une réponse immunitaire se monte contre l'organisme et que les effecteurs puissent le détruire (Ochsenbein AF, 2002 p.1048).

chercheurs ont conclu que toutes les tumeurs étaient infiltrées par des lymphocytes T activés (exprimant le récepteur de l'interleukine 2) (Georgiannos SN, 2003).

La formation et la croissance des tumeurs dans les patients au système immunitaire efficace et fonctionnel peuvent en partie être expliquées par l'expansion clonale des cellules tumorales. La combinaison de mutations somatiques successives à l'intérieur des cellules tumorales ainsi que la pression de sélection menée par le système immunitaire expliquent l'expansion clonale des cellules tumorales. L'expansion clonale des tumeurs stipule que les cellules tumorales reconnues par le système immunitaire sont détruites tandis que celles ayant acquis de nouvelles mutations ne sont plus reconnues par les effecteurs spécifiques, survivent et se multiplient jusqu'à ce qu'elles soient reconnues par de nouveaux effecteurs ou qu'elles échappent encore au système immunitaire grâce à de nouvelles mutations. (Garcia-Lora A, 2003)

De plus, plusieurs effecteurs du système immunitaire relâchent des molécules pouvant dans certains cas favoriser la mise en place de l'immunité cellulaire cytotoxique et dans d'autre cas lui nuire. Par exemple, l'IL-2 peut être pro-apoptotique pour les lymphocytes T activés, l'IFN γ peut induire l'expression de ligands se fixant aux récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T et des cellules NK et les macrophages peuvent relâcher des métabolites de l'oxygène qui inhibent les lymphocytes T (Pawelec G, 2003).

En plus de l'expansion clonale des tumeurs et de la double action que possèdent certaines molécules relâchées par les cellules du système immunitaire, plusieurs autres mécanismes permettent aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire.

1. Mécanismes impliquant les antigènes (Ag) tumoraux :

Les antigènes tumoraux sont des protéines portées à la surface des cellules tumorales pouvant être captées et digérées par les CPA puis présentées par ces cellules aux autres cellules du système immunitaire sous la forme de peptide (fragment antigénique d'une protéine) afin de monter une réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Pour échapper au système immunitaire, les cellules tumorales peuvent diminuer l'expression de ces Ag immunostimulants à leur surface, présenter des Ag qui ne sont pas immunostimulant (non reconnus comme étrangers) ou encore relâcher une trop grande quantité d'Ag immunostimulants dans l'environnement de la tumeur afin de mener à l'épuisement du système immunitaire. Voici plus en détails chacun de ces trois mécanismes d'échappement.

- Ag tumoraux immunostimulant non exprimés à la surface des cellules tumorales.

Trois mécanismes peuvent mener à une expression inadéquate des Ag tumoraux à la surface des cellules tumorales. Le premier consiste en une perte d'expression des CMH I à la surface des cellules tumorales. Les CMH I sont des molécules essentielles pour la présentation des Ag cellulaires normaux et tumoraux. Dans différentes études, il a été démontré que 96% des carcinomes cervicaux, 96% des carcinomes mammaires, 87% des carcinomes colorectaux et 70% des carcinomes laryngés n'expriment plus le CMH I à leur surface (Koopman LA, 2000), (Cabrera T, 1996), (Cabrera T, 1998), (Cabrera T, 2000). Puisque les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent seulement des Ag portés par les CHM I et que ces lymphocytes sont considérés comme les effecteurs les plus importants dans l'immunité cellulaire cytotoxique, la perte d'expression des CMH I à la surface des cellules tumorales permet à ces dernières d'échapper à la destruction. La perte d'expression des CMH I provient souvent suite à la délétion de la chaîne β 2-microglobuline du CMH I ou suite à la perte des protéines TAP impliquées dans le transport des Ag sur les CMH I dans la cellule avant que les CMH I ne migrent à la surface de celle-ci (Pawelec G, 2003).

Le deuxième mécanisme consiste en une simple diminution de l'expression des Ag tumoraux immunostimulant à la surface des

cellules tumorales. Par exemple, une étude a montré que les cellules tumorales de tumeurs d'Hodgkin sont capables de diminuer leur expression de l'Ag immunodominant d'EBV (Epstein-Barr Virus) à leur surface (Rooney CM, 2002).

Quant à lui, le troisième mécanisme consiste en une modulation rapide des Ag tumoraux par des mutations somatiques successives. Ces mutations empêchent donc un Ag d'être présent suffisamment longtemps à la surface des cellules tumorales pour permettre à une réponse immunitaire adéquate de se mettre en place contre lui.

De plus, ces mutations somatiques mènent à une pression de sélection clonale en détruisant les cellules tumorales étant reconnues par le système immunitaire et en laissant intactes les cellules tumorales ayant acquis de nouvelles mutations. Ces dernières peuvent par la suite se multiplier sans être détruites par les effecteurs cytolytiques du système immunitaire (Bathe O, 2003).

- Ag tumoraux non reconnus comme étrangers (AAT)

Les AAT sont des Ag présents dans les tissus tumoraux, et en une moindre proportion, dans les tissus sains. Lors de l'embryogenèse, un mécanisme appelé « délétion clonale » mène à

la destruction des lymphocytes T reconnaissant les Ag sains avec une forte affinité. Ce mécanisme existe pour minimiser l'apparition de maladies auto-immunitaires au cours de la vie de l'animal. Les lymphocytes qui reconnaissent les AAT sont détruits par la même occasion, puisque dans l'embryon, les AAT ne sont généralement exprimés que sur des cellules saines. Plus tard, dans la vie de l'animal, si ce dernier développe une tumeur portant un AAT comme Ag immunodominant, le système immunitaire est alors incapable de réagir contre ce AAT et la tumeur grandit à l'abri des lymphocytes T cytolytiques (De Visser KE, 2003).

- Expression des Ag tumoraux en excès.

Qu'ils soient exprimés à la surface des cellules tumorales ou relâchés dans l'environnement de la tumeur sous forme d'Ag libres, les Ag exprimés en excès mènent à un mécanisme appelé « épuisement » ou « paralysie » des lymphocytes B et T (Tizard IR, 2000 p.183-184).

Par ailleurs, une étude a démontré que les Ag MICA et MICB (soit 2 Ag retrouvés sur les carcinomes colorectaux et reconnus par les cellules NK) se détachent des cellules de carcinomes colorectaux et qu'ils inactivent les cellules NK une fois qu'ils se retrouvent libres dans l'environnement des tumeurs. En effet, ces Ag solubles se

fixent sur les récepteurs NKG2D des cellules NK, provoquent l'internalisation des récepteurs et abolissent alors les fonctions cytolytiques des cellules NK envers les cellules des carcinomes colorectaux (Dobrovina ES, 2003).

2. Mécanismes impliquant un défaut des CTL

Les lymphocytes T peuvent être inaptes à accomplir adéquatement leurs fonctions suite à l'acquisition de certains défauts apparaissant dans la structure de leur récepteur membranaire (complexe TCR) ou au niveau de la signalisation effectuée par ces récepteurs. Le complexe TCR des lymphocytes T est constitué d'un TCR et d'une molécule CD3. Le TCR reconnaît l'Ag porté par les CMH sur les CPA ou les cellules cibles tandis que la molécule CD3 permet la transduction du signal obtenu suite à la liaison du TCR à l'Ag vers les molécules cytoplasmiques des lymphocytes T. Le TCR est formé de deux chaînes (α/β ou γ/δ) tandis que la molécule CD3 est formée de six chaînes (où deux d'entre elles, les chaînes ζ , servent à la transduction du signal) (figure 4). Dans les lymphocytes infiltrant certaines tumeurs, la chaîne ζ n'est pas exprimée ou s'associe de façon anormale avec les autres chaînes de la molécule CD3 amenant du même coup un arrêt de la transduction du signal dans le lymphocyte. L'importance de la transduction adéquate des signaux dans les

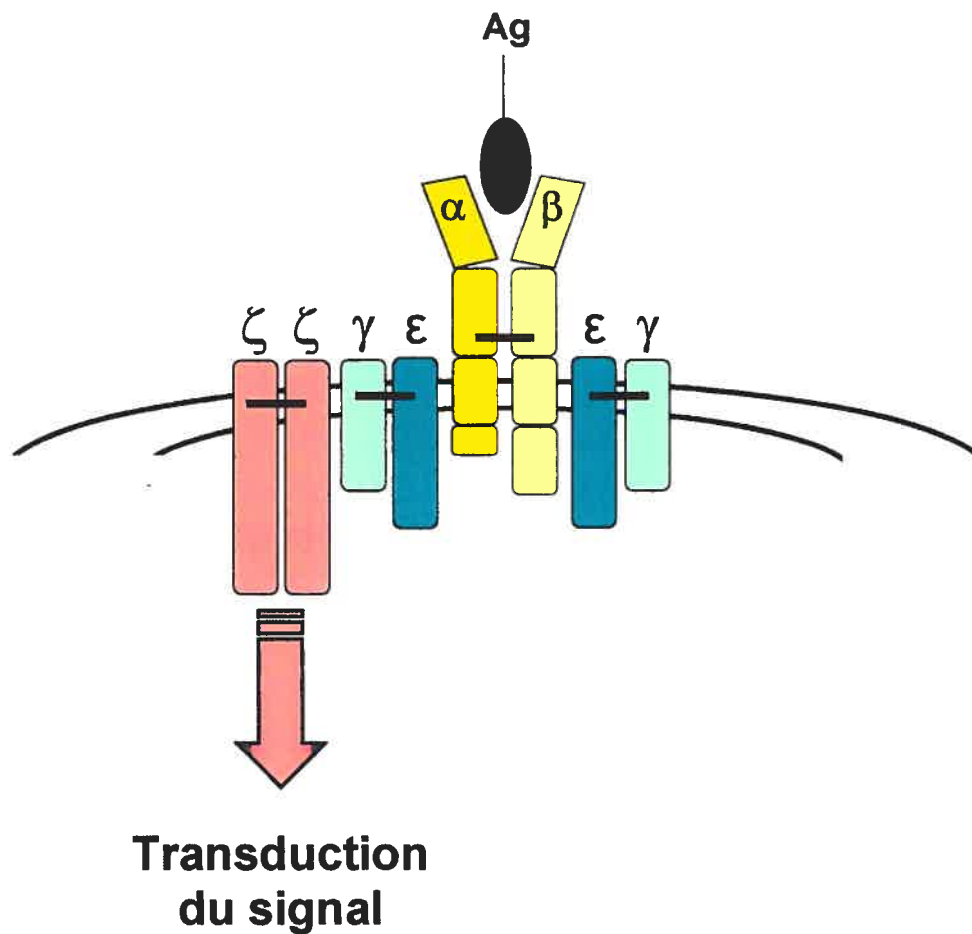


Figure 4. La structure complète du complexe TCR des lymphocytes T (CD4+ et CD8+). Les humains, les rongeurs et la majorité des animaux non ruminants possèdent 90 à 99% de leur TCR constitués d'une chaîne α et d'une chaîne β . Le complexe comprend aussi une molécule CD3 formée des chaînes ϵ , γ et ζ . Par ailleurs, ce sont ces dernières (chaînes ζ) qui sont responsables de la transduction du signal initié par la liaison de l'Ag au TCR vers l'intérieur du lymphocyte T.

lymphocytes T pour la mise en place d'une immunité antitumorale est démontrée dans une étude sur les carcinomes oraux humains. Dans cette étude de 130 patients, ceux qui portaient des tumeurs infiltrées de lymphocytes T possédant une expression faible ou absente de la chaîne ζ montraient une espérance de vie diminuée de 5 ans comparativement aux patients où les lymphocytes T intratumoraux possédaient une expression normale de la chaîne ζ (Whiteside TL, 2003). Les métabolites de l'oxygène relâchés par les macrophages font parti des facteurs responsables de l'expression inadéquate des chaînes ζ du TCR des lymphocytes intratumoraux (Pawelec G, 2003).

Par ailleurs, un autre défaut parfois vu dans les lymphocytes T cytotoxiques est une activité diminuée du facteur de transcription NF κ B. Le facteur NF κ B est très important puisqu'il contrôle l'expression de plusieurs gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, pour les récepteurs de ces cytokines ainsi que pour des molécules membranaires essentielles à l'activation des lymphocytes T. Une étude a démontré que l'activité altérée du facteur de transcription NF κ B était due à une exposition des lymphocytes T à des gangliosides produits par les cellules tumorales de carcinomes rénaux (Whiteside TL, 2003).

Finalement, une troisième étude montre que le surnageant de carcinomes ovariens bloque l'expression des chaînes β et γ_c du récepteur

de l'IL-2 des lymphocytes CD8+ empêchant ainsi leur activation et leur prolifération. L'absence de ces deux chaînes est aussi couplée à une diminution d'expression de la protéine JAK3 et du facteur de transcription STAT5, deux éléments essentiels dans la signalisation intracellulaire subséquente à la liaison de l'IL-2 à son récepteur. De plus, les lymphocytes exposés aux surnageant des carcinomes ovariens possèdent une expression diminuée d'IFN γ et une expression augmentée d'IL-10 leur conférant ainsi un profil beaucoup plus immunosuppresseur que cytotoxique (Wang H, 2004).

3. Mécanismes impliquant les molécules de co-stimulation et d'adhésion.

Comme vu précédemment, les molécules de co-stimulation et d'adhésion sont des molécules portées par les CPA et sont essentielles à l'activation des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. De plus, ces molécules de co-stimulation et d'adhésion sont aussi portées par les cellules tumorales et sont essentielles pour que les lymphocytes T cytolytiques reconnaissent ces cellules tumorales afin de procéder à leur destruction. Parmi les molécules de co-stimulation et d'adhésion exprimées souvent inadéquatement, nous retrouvons B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ICAM-1 et CD40 (Pawelec G, 2003).

Parfois, les cellules tumorales n'expriment pas les molécules de co-stimulation et d'adhésion. Une étude a donc vérifié l'impact de l'ajout des

molécules B7-1 et de B7-2 à la surface de cellules de carcinomes mammaires. L'étude montre que les cellules tumorales exprimant B7-1 ou B7-2 sont capables d'augmenter substantiellement la prolifération des lymphocytes canins périphériques *in vitro* comparativement aux lymphocytes canins périphériques mis en culture avec des cellules de carcinomes mammaires n'exprimant pas ces deux molécules (Whitley EM, 2002). Ce bénéfice reste donc à être vérifié en modifiant des cellules cancéreuses *in vivo*.

Il arrive aussi que les CPA présents dans une tumeur soient déficients dans l'expression des molécules de co-stimulation et d'adhésion, comme dans une étude réalisée par Bubanovic en 2003. Cette équipe de chercheurs a démontré que les CPA étaient déficients dans l'expression de deux des molécules essentielles à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, soit B7-1 et CD40 et que les lymphocytes interagissant avec ces CPA devenaient anergiques au lieu de devenir des effecteurs cytolytiques (Bubanovic IV, 2003).

4. Mécanismes impliquant l'immunosuppression

L'environnement dans lequel se retrouvent les effecteurs de l'immunité cellulaire cytotoxique est très important. Il doit posséder des caractéristiques spécifiques afin de maximiser les réponses immunitaires.

Il arrive cependant que des cellules tumorales modifient cet environnement et, du même coup, interfèrent avec l'activité des effecteurs. Il a été démontré depuis de nombreuses années que le sérum de patients cancéreux possède une variété impressionnante de protéines immunosuppressives (CD54, CD58, CD95, MUC-1, MUC-2, annexine II, défensines, adénosine, TGF β , IL-10 et IL-6) (Pawelec G, 2003).

Dans certains cas, les cellules tumorales peuvent réussir à moduler l'expression de certaines cytokines dans les effecteurs de l'immunité cellulaire. En effet, une étude de Clarke J. H. *et al.* montre que des cellules de mélanome diminuent l'expression de l'IL-12 dans les cellules dendritiques (cellules faisant partie de la famille des CPA) (Clarke JH, 2003).

Parfois, les cellules tumorales produisent elles-mêmes des cytokines ayant une action suppressive sur l'immunité cellulaire cytotoxique telles que TGF β ou IL-10 car ces cytokines antagonisent l'action des cytokines IL-12 et IFN γ , soit deux cytokines très importantes pour la mise en place de l'immunité cellulaire cytotoxique (Tizard IR, 2000 p.136). Les tumeurs d'Hodgkin produisant la cytokine immunosuppressive TGF β sont un exemple concret de ce mécanisme d'évasion des cellules tumorales (Rooney CM, 2002).

De plus, les cellules tumorales peuvent produire d'autres molécules immunosuppressives telles que les métabolites de l'acide arachidonique.

En effet, il a été démontré que des carcinomes transitoires canins, des carcinomes prostatiques canins ainsi que des carcinomes spinocellulaires canins produisent le métabolite inflammatoire et immunosuppresseur PGE₂ (prostaglandine E₂) (Mohammed SI, 2001).

Les cellules tumorales ne sont pas les seules responsables de la nature de l'environnement dans lequel baignent les effecteurs cytolytiques. Il arrive aussi que des cellules du système immunitaire (effecteurs suppresseurs) mettent en place un environnement défavorable à une réponse antitumorale en produisant des cytokines immunosuppressives. En temps normaux, les effecteurs suppresseurs servent à contrôler les réactions immunitaires exagérées et donc dommageables pour l'animal. Lors de la lutte contre le cancer, ces mêmes effecteurs suppresseurs permettent malheureusement la croissance des cellules tumorales en inactivant les effecteurs cytolytiques. Une étude a démontré que certains macrophages intratumoraux produisent des métabolites de l'oxygène ainsi que les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF β tandis qu'une deuxième étude a montré que des lymphocytes auxiliaires (CD4⁺ CD25⁺) dits suppresseurs (nommés T_s ou T_r selon les différents auteurs) et situés dans les tumeurs produisent ces mêmes cytokines immunosuppressives (Whiteside TL, 2003).

5. Mécanismes conférant un pouvoir apoptotique aux cellules tumorales.

Un dernier mécanisme exploré consiste à l'acquisition d'un pouvoir apoptotique sur les effecteurs de l'immunité cellulaire par les cellules cancéreuses. Certaines cellules cancéreuses, telles les cellules de carcinomes pulmonaires, sont réputées pour exprimer dans une proportion de 100% la molécule FasL (CD95L) à leur surface, molécule provoquant l'apoptose de tout lymphocyte entrant en contact avec elles s'il porte à sa surface la molécule Fas (CD95) (Bubanovic IV, 2003). Or, les lymphocytes cytolytiques expriment souvent les molécules FasL et Fas à leur surface très tôt au cours de l'immunité cellulaire cytotoxique, plus précisément dès qu'ils sont activés par l'IL-2 produite par les lymphocytes Th1 (Tizard IR, 2000)

Plusieurs autres mécanismes d'évasion des tumeurs sont recensés dans la littérature. Parmi eux, on retrouve toutes les modifications possibles à l'intérieur de la voie apoptotique médiée par les molécules Fas/FasL. Ces modifications sont l'expression de Fas sans domaine intracellulaire à la surface des cellules tumorales (ce qui empêche la cascade apoptotique de s'effectuer dans les cellules tumorales), l'expression de Fas solubles par les cellules tumorales qui vont se fixer sur les CTL et mènent à leur apoptose avant même qu'ils entrent en contact avec les cellules tumorales ainsi que la diminution d'expression de Fas à la surface des cellules tumorales.

2. La thérapie génique du cancer

2.1 Définition

La thérapie génique du cancer consiste en l'introduction de gène synthétique dans des cellules cancéreuses ou dans des cellules dans l'environnement des masses tumorales dans le but d'amener la destruction de la tumeur et de ses métastases si elles sont présentes. La thérapie génique est un système utilisé pour traiter plusieurs types de pathologie. Cependant, en 2002, le cancer chez les humains monopolisait 63.1% des essais totaux faits en thérapie génique (figure 5) (Evans ME, 2002).

2.2 Les différentes voies expérimentées en thérapie génique du cancer

Plusieurs voies sont présentement explorées pour le traitement du cancer en thérapie génique. Parmi les différents gènes utilisés, se retrouvent : les gènes suicides (15.5% des protocoles en thérapie génique chez les humains utilisaient ce type de gène en juin 1999), les gènes antiangiogéniques, ceux suppresseurs de tumeur (11.9%), les oncogènes antisens (1.6%), les gènes de résistance à de multiples médicaments ainsi que les gènes immunostimulants (61.7%) (figure 6) (Gunji Y, 2000).

Les gènes suicide convertissent généralement des prodrogues inactives en composés toxiques pour les cellules qui possèdent le gène tout

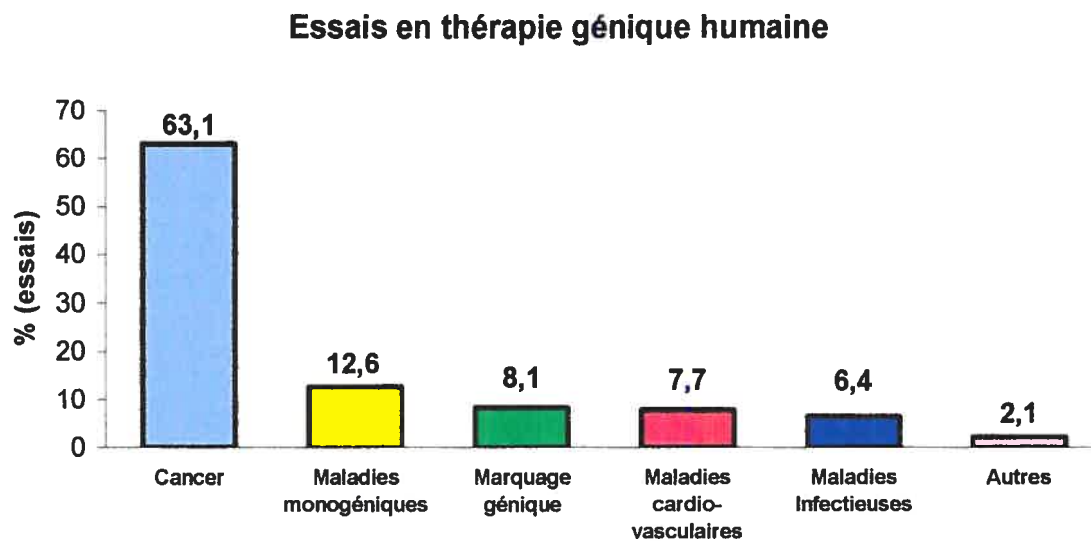


Figure 5. Histogramme représentant le pourcentage des essais cliniques en thérapie génique faits dans différents domaines de la médecine humaine. Les protocoles de thérapie génique visant le traitement du cancer comptent pour 63.1% des essais cliniques en thérapie génique. Suivent ensuite les protocoles visant le traitement des maladies monogéniques telles que l'hémophilie A et l'hémophilie B comptant pour 12.6% des essais totaux puis les protocoles visant le traitement des maladies cardiovasculaires (7.7%) et des maladies infectieuses (6.4%).

Voies en thérapie génique du cancer

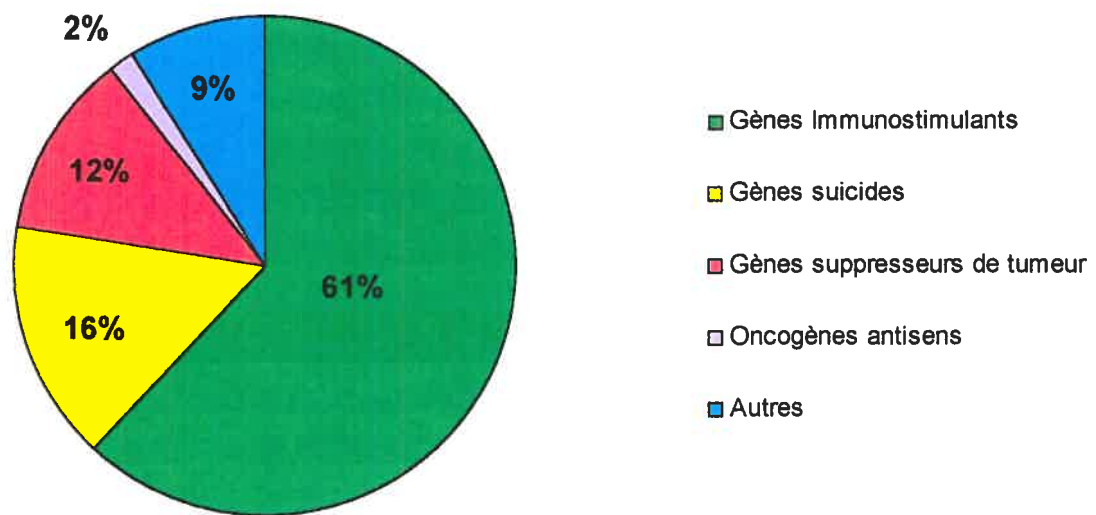


Figure 6. Les différentes voies explorées en thérapie génique du cancer. La majorité des essais effectués utilisent les gènes immunostimulants (61%). Viennent ensuite les essais utilisant les gènes suicides (16%), les gènes suppresseurs de tumeur (12%) et finalement, les oncogènes antisens (2%). La catégorie autre englobe 9% des essais cliniques totaux en thérapie génique du cancer et comporte d'autres voies telles que les gènes anti-angiogéniques et les gènes de résistance à de multiples médicaments.

en ayant un effet minimal sur les cellules avoisinantes n'ayant pas acquis le gène (ce qui permet d'épargner les cellules saines situées autour de la tumeur). Parmi eux, le gène le plus souvent utilisé est celui de la thymidine kinase du virus herpès simplex (*HSV-tk*). Le mécanisme d'action de ce gène consiste en la phosphorylation de la prodrogue inactive ganciclovir (GCV) en un composé toxique, le ganciclovir phosphorylé (GCV-p). Le GCV-p est ensuite incorporé dans l'ADN de la cellule porteuse du gène et agit comme un analogue des nucléotides-phosphate. La cellule incorporant le GCV-p dans son ADN voit sa synthèse d'ADN bloquée ainsi que sa polymérase d'ADN inhibée et elle meurt (Yazawa K, 2002). Un avantage majeur de ce système est le « bystander effect », avantage par lequel les cellules avoisinant celles qui ont acquis le gène *HSV-tk* meurent elles aussi. Deux mécanismes semblent être responsables de ce phénomène : premièrement l'acquisition du GCV-p dans le cytoplasme des cellules voisines via des connexions intercellulaires entre les cellules possédant le gène thérapeutique et celles ne l'ayant pas et deuxièmement la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale grâce à la libération d'antigènes tumoraux immunostimulants lors de la mort des cellules contenant le GCV-p. Le « bystander effect » augmente donc l'efficacité de la thérapie, compensant les faibles efficacités de transduction vues lors des protocoles *in vivo* (Yazawa K, 2002).

Plusieurs essais cliniques ont utilisé, seul ou en combinaison avec un autre gène, le gène suicide *HSV-tk*. Un récent protocole testait l'utilisation d'*HSV-tk* en combinaison avec l'interleukine-2 (gène immunostimulant) et démontrait que la mort accrue des cellules cancéreuses et la libération subséquente de grandes quantités d'antigènes (effet médié par *HSV-tk*) ainsi que l'activation du système immunitaire à proximité de cette forte libération d'antigènes (effet médié par IL-2) permettait un effet anticancer accru dans un modèle de carcinome thyroïdien (Barzon L, 2003).

Un autre gène utilisé en thérapie suicide consiste en celui de la cytosine déaminase (*CD*). Ce gène catalyse la transformation de la prodrogue 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU), un composé toxique qui, suite à quelques modifications par les enzymes cellulaires, inhibe de façon irréversible la thymidylate synthase et provoque la carence de dTTP, un nucléotide essentiel à la synthèse de l'ADN. Suite à cette carence surviennent un arrêt de la synthèse de l'ADN et la mort de la cellule contenant le 5-FU. Mentionnons cependant que certaines entérobactéries faisant partie de la flore intestinale normale possèdent l'enzyme CD et, à cause de cela, des effets secondaires au niveau du système digestif sont parfois observés lors des essais cliniques des protocoles de thérapie génique suicide utilisant le système CD-5FC. (Yazawa K, 2002)

Les gènes antiangiogéniques permettent la suppression de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Grâce à la thérapie génique,

cette suppression peut être confinée dans l'environnement de la tumeur. Les tumeurs solides nécessitent de nouveaux vaisseaux sanguins dès que leur taille atteint 1 à 2 mm³ pour continuer leur croissance (apport de nutriments et rejet des déchets cellulaires) ainsi que pour former des métastases (Zi-Lai Z, 2003). Puisque la néovascularisation est un phénomène résultant de l'équilibre entre l'effet des molécules proangiogéniques et antiangiogéniques, deux stratégies sont utilisées en thérapie génique du cancer : diminuer les facteurs essentiels à l'angiogenèse (VEGF, FGF, PA, MMP, intégrines, etc.) ou augmenter les facteurs antiangiogéniques (angiostatine, endostatine, VEGI, vasostatine, anti-thrombine III, etc.) (Zi-Lai Z, 2003).

Par ailleurs, il a été démontré que l'angiostatine (molécule antiangiogénique provenant de la modification du plasminogène endogène par les protéinases cellulaires) produite par les cellules tumorales de la tumeur primaire permet de contrôler le taux de progression des métastases pulmonaires d'ostéosarcome chez le chien. En effet, plus de 80% des chiens qui subissent une amputation du membre portant un ostéosarcome meurent en quelques mois suite à une progression rapide et fatale des métastases pulmonaires. Or, avant l'amputation du membre affecté, ces chiens possèdent un taux détectable d'angiostatine dans leur urine tandis qu'après l'amputation, aucune angiostatine ne reste détectable à ce niveau. L'auteur suggère donc que l'angiostatine est produite par les cellules tumorales de la tumeur primaire d'ostéosarcome et qu'elle freine la progression des métastases pulmonaires de ces ostéosarcomes chez le chien (Pirie-Shepherd

SR, 2002). Basé sur ces résultats et sur ceux d'autres études, des chercheurs ont introduit le gène de l'angiostatine dans des cellules tumorales afin de freiner l'angiogenèse à l'intérieur des masses tumorales et de diminuer la formation de métastases.

Les gènes suppresseurs de tumeur sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la transcription, le cycle cellulaire et l'apoptose. Ils sont généralement sollicités lorsqu'un dommage est détecté à l'intérieur d'une cellule (souvent au niveau de l'ADN) afin d'empêcher sa prolifération et/ou de mener à sa mort. Parmi les nombreux gènes suppresseurs de tumeur, nous retrouvons *p53*, *Rb*, *p21* et *PTEN*.

Plusieurs études ont été faites sur le gène *p53*, gène qui encode un facteur de transcription nucléaire qui réduit la croissance cellulaire en réponse à plusieurs stress (Kichina JV, 2003). La protéine p53 détecte les cellules ayant un dommage à leur ADN, les arrête dans la phase G1 du cycle cellulaire, active les enzymes nécessaires à la réparation de l'ADN ou conduit ces cellules vers l'apoptose si les dommages génétiques sont trop importants (Laiho M, 2003). Environ la moitié des cancers humains (cancer du sein, ostéosarcome, cancer du côlon et cancer du poumon) portent une mutation dans le gène *p53*. Parallèlement, plusieurs types de tumeurs portent une mutation dans ce gène chez l'espèce canine. Par exemple, 47% des ostéosarcomes appendiculaires canins portent une mutation ponctuelle dans

le gène *p53* (Vail DM, 2000). Une étude a démontré que le gène *p53* transduit dans des lignées cellulaires canines d'ostéosarcome et d'adénocarcinome mammaire inhibe leur prolifération par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et provoque leur apoptose (Yazawa M, 2003). Par ailleurs, une autre étude montre que des mélanomes humains ayant un taux élevé de *p53* endogène semblent sensibles à leur transduction de ce même gène (*p53*) à l'aide de rétrovecteurs. Il semble que la protéine *p53* endogène était fonctionnelle mais réprimée par des facteurs encore inconnus des auteurs (Kichina JV, 2003).

Les protooncogènes sont des gènes impliqués dans la division cellulaire. Une fois mutés, ces protooncogènes prennent alors l'appellation d'oncogènes et provoquent souvent une division incessante et incontrôlée des cellules par divers mécanismes. Parmi les protooncogènes fréquemment étudiés, on retrouve *myc* et *ras* (Weinstein IB, 2002) (Polsky D, 2003) (Wang H, 2001) (Volpert OV, 2003). Dans les oncogènes de la famille *ras*, *N-ras* a été détecté chez l'humain dans certaines formes de leucémies, de lymphomes, de sarcomes, de séminomes et de mélanomes (Mayr B, 2003).

Par ailleurs, *Bcl-xL* est un protooncogène membre de la famille anti-apoptotique *Bcl-2* et il régularise le potentiel membranaire mitochondrial afin de bloquer le relâchement du cytochrome-C et du facteur inducteur d'apoptose dans le cytoplasme. Il a été démontré que *Bcl-xL* est impliqué dans le mécanisme de résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie

dans certains cancers humains. Une autre étude a démontré que le niveau d'expression de *Bcl-xL* était élevé dans les lignées cellulaires canines CL-1 (lymphome) et GL-1 (leucémie des cellules B) et qu'il était augmenté comparativement au niveau d'expression observé dans des lymphocytes périphériques canins non stimulés (Sano J, 2003).

Les oncogènes antisens sont, quant à eux, des oligonucléotides synthétiques antisens d'ARN ou d'ADN spécifiques à des ARNm ou des ADN d'oncogènes respectivement. Les oncogènes antisens empêchent donc la traduction ou la transcription de l'information génétique codant pour les oncogènes retrouvés dans les cellules cancéreuses. Parmi les oncogènes antisens existent *myc-AS*, *ras-AS*, *Her-2/neu-AS* et *Bcl-xL-AS*, soit des oligonucléotides qui se fixent sur l'ARNm ou l'ADN des oncogènes *myc*, *ras*, *Her-2/neu* et *Bcl-xL* empêchant ainsi la prolifération incessante et incontrôlée des cellules cancéreuses. Par exemple, il a été montré que *ras-AS* bloquait la prolifération d'une lignée cellulaire humaine de cancer du pancréas surexprimant l'oncogène *ras* et que *Her-2/neu-AS* bloquait la prolifération d'une lignée cellulaire humaine de cancer du sein surexprimant l'oncogène *Her-2/neu* (Weinstein IB, 2002).

Les gènes de résistance à de multiples médicaments sont des gènes codant pour une pompe membranaire permettant l'efflux de composés toxiques entrés dans la cellule. Parmi eux, on retrouve le gène *MDR1* codant

pour une pompe transmembranaire rejetant des cellules la daunorubicine, la vincristine, l'etoposide, la colchicine, le paclitaxel et d'autres molécules pharmaceutiques. En traitant le patient avec de fortes doses de ces composés toxiques, les cellules tumorales sont tuées alors que les cellules saines sélectionnées et transduites *in vitro* avec *MDR1* puis réintroduites dans le patient résistent au traitement. Les gènes de résistance à de multiples médicaments permettent le traitement de patients cancéreux avec des doses élevées de médicaments qui autrement tueraient le patient à cause d'effets secondaires trop sévères.

Le traitement de cancers hématopoïétiques représente un défi particulier puisqu'il nécessite une transduction efficace des cellules saines et une expression à long terme du gène. Or, la multiplication incessante des cellules souches amène rapidement une dilution des cellules périphériques transduites. De cette dilution émerge l'idée de pouvoir rétablir l'expression du gène lorsque son niveau décroît et donc, l'utilisation d'un gène de résistance à de multiples médicaments tel que *MDR1*. Donc, la double transduction de cellules saines périphériques avec *MDR1* et un autre gène thérapeutique (récepteur d'interleukine ou autre) permet la sélection par chimiothérapie des cellules portant de façon stable ce gène thérapeutique (Licht T, 2002).

Dans un autre ordre d'idée, l'antisens du gène de résistance à de multiples médicaments peut être introduit dans différents cancers résistants à la chimiothérapie pour essayer de sensibiliser les cellules tumorales aux

molécules chimiques utilisées mais inefficaces à des doses sécuritaires pour le patient (Ramachandran C, 2003).

Les gènes immunostimulant sont les gènes le plus souvent utilisés dans les protocoles de thérapie génique du cancer chez l'humain (61.7% des protocoles de thérapie génique en juin 1999 (Gunji Y, 2000)). Ils se séparent en trois grandes catégories. Il y a d'abord les gènes codant pour les cytokines soit les interleukines (IL-2, IL-12, etc.), les facteurs stimulant des colonies (GM-CSF, etc.), les interférons (INF γ) et les facteurs nécrosant (TNF α), qui sont toutes des molécules impliquées dans la communication intercellulaire entre les cellules de l'immunité cellulaire cytotoxique. Viennent ensuite les gènes impliqués dans les contacts intercellulaires au niveau du système immunitaire tels que les complexes majeurs d'histocompatibilité (CHM I, CHM II) et les molécules de co-stimulations et d'adhésion (B7, CD28, Fas, FasL, etc.). Plusieurs tumeurs ne sont pas immunogéniques à cause de l'absence des molécules de co-stimulation ou d'adhésion (en particulier B7) à la surface des cellules tumorales. Ces cellules tumorales mènent donc à l'anergie des lymphocytes T naïfs entrant en contact avec elles et diminuent du même coup la capacité du système immunitaire à détruire les cellules cancéreuses. Finalement, il y a les gènes codant pour des Ag associés aux tumeurs (AAT). Ces gènes sont ceux portés normalement par les CHM de type I à la surface des cellules tumorales et donc, ceux reconnus par les effecteurs cytolytiques. Ces gènes sont souvent utilisés pour créer des

vaccins tumoraux ayant le potentiel d'induire une réponse immunitaire mémoire, tant au niveau humoral qu'au niveau cellulaire (Kwak H, 2003).

De nombreuses études sont présentement en cours sur les gènes immunostimulant car les scientifiques cherchent à trouver la voie faisant défaut dans l'immunité cellulaire cytotoxique qui est le type d'immunité le plus apte à combattre les cellules cancéreuses. Une de ces études démontre que l'IL-2 arrête la prolifération des cellules cancéreuses au niveau du col de l'utérus, cancer à l'incidence très élevée chez la femme et causé par un virus papilloma humain (Casana PH, 2002).

Par ailleurs, une deuxième étude démontre que la combinaison d'IL-12 et de GM-CSF induit l'immunité innée et l'immunité acquise nécessaires à une réponse antitumorale spécifique et persistante permettant l'éradication des métastases pulmonaires d'une lignée de carcinome alvéolaire chez la souris (Hill HC, 2002). Cependant le modèle utilisé dans cette étude nous laisse supposer que ce type de résultats ne pourrait être vu lors de traitement de carcinome pulmonaire chez l'humain. En effet, la création d'une tumeur pulmonaire au niveau de l'aspect dorsal du cou des souris consiste en un modèle non orthotopique ne reflétant pas bien l'environnement dans lequel se retrouve ce type de tumeur chez l'humain. De plus, la thérapie consistant à injecter des microsphères de polymères dans la tumeur ne pourrait être appliquée dans des tumeurs pulmonaires humaines à cause de la localisation des masses tumorales. Finalement, le protocole thérapeutique comprend la

résection de la tumeur primaire 6 jours après l'injection intra-tumorale des microsphères, protocole impossible à exécuter en traitement de carcinome pulmonaire chez l'humain.

3. Immunothérapie génique et cellulaire du cancer

3.1 Définition de l'immunothérapie génique/cellulaire du cancer

L'immunothérapie génique et cellulaire du cancer consiste à transférer, dans des cellules tumorales ou des cellules effectrices du système immunitaire, un gène synthétique codant pour une protéine thérapeutique ayant pour fonction de stimuler l'immunité cellulaire cytotoxique (De Visser KE, 2003). La thérapie génique nous aide donc, en localisant le gène thérapeutique et par conséquent la protéine thérapeutique, à obtenir une concentration optimale de la protéine thérapeutique dans le microenvironnement de la tumeur tout en minimisant sa concentration systémique et les effets toxiques qui y sont associés.

Les effets toxiques associés à l'administration systémique des protéines thérapeutiques font partie des principales raisons ayant mené au développement de l'immunothérapie génique. Prenons exemple sur les thérapies utilisant l'IL-2 comme protéine thérapeutique. En 1998, l'IL-2 était la cytokine utilisée dans plus de 60% des essais cliniques humains en

immunothérapie génique du cancer (Jantscheff P, 1999). Cette cytokine est importante à cause de son effet sur plusieurs cellules participant à l'immunité cellulaire cytotoxique (site internet: www.appleton-lange.com/gentherapy). Cette cytokine demeure le seul médicament approuvé par la FDA pour le traitement des carcinomes rénaux métastatiques humains et la seule cytokine approuvée pour le traitement des mélanomes humains (Yang JC, 2003) (Waldmann TA, 2003). De plus, il est maintenant connu que les carcinomes rénaux ne sont que rarement guérissables lorsque des métastases sont retrouvées dans les patients et que la chimiothérapie (avec ou sans transplantation de cellules souches sanguines), les traitements anti-angiogéniques et les vaccinations tumorales sont des stratégies de traitement ayant échoué dans l'objectif de guérir les patients atteints de carcinomes rénaux (Huland E, 2003).

Dans une de leurs études, Rosenberg *et al.* notent qu'après une administration intraveineuse de fortes doses d'IL-2rh, 9% des patients ayant un carcinome rénal et 7% des patients ayant un mélanome ont connu une réponse complète. Toutefois, l'administration systémique d'IL-2rh fut associée à une importante toxicité nommée « leak syndrome » (Rosenberg SA, 2001). Mentionnons simplement que cet effet toxique observé est un phénomène découlant d'une perméabilité vasculaire accrue suite à un dommage endothélial extensif et qu'il amène plusieurs signes cliniques tels que l'hypotension, des nausées et/ou des vomissements, l'oligurie et la désorientation. De plus la fièvre, les tremblements, la diarrhée, les difficultés

respiratoires, l'œdème, l'azotémie, l'anémie, la thrombocytopénie et les arythmies cardiaques sont des signes cliniques parfois rencontrés lors d'administration d'IL-2 par voie systémique (Tizard IR, 2000) (Yang JC, 2003).

Pour diminuer le plus possible la toxicité systémique, Yang J. C. *et al.* ont testé une administration intraveineuse d'IL-2 à une dose plus faible (72,000 U/kg comparativement à 720,000 U/kg). Ce groupe de chercheurs a démontré qu'un traitement à dose plus faible amenait quand même la régression des carcinomes rénaux métastatiques humains (4% de réponse complète comparativement à 7% de réponse complète si la dose élevée est utilisée), que ce traitement évitait l'apparition d'une toxicité systémique et qu'il ne réduisait pas le taux de survie des patients humains cancéreux comparativement au taux de survie obtenu lors de traitement avec une dose plus élevée (Yang JC, 2003). Par contre, le faible taux de succès rencontré avec ce type de traitement (IL-2 administré par voie systémique à faible dose) soit 4% de réponses complètes nous amène à souhaiter un traitement plus efficace, plus pratique et plus économique. De plus, le traitement avec de faibles doses d'IL-2 intraveineuses est inefficace lorsque qu'on souhaite traiter des mélanomes.

Par ailleurs, les molécules humaines synthétiques disponibles commercialement sont très dispendieuses (Kruth SA, 1998). Un traitement plus universel et moins coûteux est donc aussi souhaité (Yang JC, 2003).

3.2 Immunothérapie génique

3.2.1 Définition

L'immunothérapie génique du cancer consiste à transférer des gènes immunostimulants dans des cellules des patients sans avoir à prélever ces cellules et à les manipuler en laboratoire. Les gènes sont donc administrés nus ou à l'intérieur de différents véhicules directement dans les tissus (le plus souvent la tumeur) dans les patients cancéreux.

3.2.2 Méthodes d'insertion des gènes thérapeutiques dans le patient

Afin d'insérer les gènes synthétiques thérapeutiques dans les cellules du patient sans prélever ces cellules et sans les manipuler en laboratoire, plusieurs approches s'offrent à nous, soit l'administration du gène nu, l'administration du gène en complexe avec des molécules cationiques (polymères, peptides ou lipides) ou l'administration de véhicules viraux contenant le gène thérapeutique (vecteurs viraux). Le but de la thérapie génique (et des vecteurs choisis pour véhiculer le(s) gène(s)) varie selon la maladie à traiter. En effet, une expression prolongée et soutenue des gènes est essentielle pour traiter des maladies découlant d'une dysfonction d'un gène (ex. : hémophilie A) tandis qu'une expression transitoire du gène est souvent suffisante pour traiter des cancers.

3.2.2.1 ADN nu

La première approche consiste à employer de l'ADN nu pour insérer le gène thérapeutique dans les cellules tumorales du patient. Les principaux avantages d'injecter directement le gène synthétique dans les masses tumorales sont la simplicité de la méthode, la faible immunogénicité de l'ADN ainsi que la possibilité de produire à grande échelle le matériel à être transféré (soit l'ADN codant pour le gène thérapeutique). Par contre, le principal désavantage consiste en une faible efficacité de transfert, une caractéristique qui n'est pas désirée lors de thérapie génique *in vivo* (Wang JH, 2003)

Les autres approches consistent à utiliser un vecteur contenant le gène thérapeutique. Un bon vecteur permet une délivrance efficace du gène en le protégeant des mécanismes de dégradation existant dans le patient, il est apte à s'échapper de la dégradation lysosomale et est capable de cibler les cellules à être transduites. Par ailleurs, ce vecteur doit être stable lors de l'entreposage, facile à synthétiser, capable d'accueillir des gènes de taille importante (ou plusieurs gènes à la fois) et sécuritaire pour les patients traités (El-Aneed A, 2004). Parmi ces véhicules, nous retrouvons principalement les molécules cationiques ainsi que les vecteurs viraux.

3.2.2.2 Les molécules cationiques

Les molécules cationiques interagissent avec l'ADN chargé négativement à travers des liens électrostatiques. La charge totale des complexes reste cependant positive leur permettant par la suite de réagir efficacement avec les membranes cellulaires chargées négativement. Ces molécules sont rarement restreintes quant à la taille du matériel génétique qu'elles peuvent transporter mais leur efficacité de transfert génique est généralement plus faible que l'efficacité obtenue lorsque les vecteurs viraux sont utilisés (El-Aneed A, 2004).

Trois catégories de molécules cationiques sont utilisées en thérapie génique, soit : les polymères cationiques, les peptides cationiques et les lipides cationiques (aussi appelés liposomes) (El-Aneed A, 2004).

Parmi les polymères cationiques, les deux molécules les plus étudiées sont le polyéthylèneimine (PEI) et le poly(L-lysine) (PLL). Le PEI possède l'avantage de déstabiliser les membranes lysosomales permettant ainsi aux gènes synthétiques d'échapper à la dégradation acide vue dans les endosomes. Par ailleurs, une étude montre que l'ajout de transferrine aux polymères de PEI permet d'augmenter leur efficacité de transduction tout en diminuant leur toxicité (Kircheis R, 1999). Tant qu'à lui, le PLL est un polypeptide qui possède une nature biodégradable qui est très utile pour les thérapies *in vivo*. Par contre, le PLL est rapidement lié aux protéines plasmatiques et

ainsi éliminé de la circulation sanguine du patient, phénomène qui réduit beaucoup son efficacité de transfert des gènes synthétiques (El-Aneed A, 2004).

Les peptides cationiques sont des peptides amphotropiques capables de modifier leur conformation dans des environnements acides et pouvant donc échapper aux lysosomes et aux endosomes. Les peptides cationiques ont été utilisés dans plusieurs protocoles *in vitro* mais leur comportement lors de protocoles *in vivo* est encore sous investigation (El-Aneed A, 2004).

Les lipides cationiques sont des molécules amphotropiques composées d'une ou de deux chaînes d'acides gras, d'une pièce joignante et d'un groupe d'acides aminés hydrophiliques. Dans un milieu aqueux, les lipides cationiques s'assemblent spontanément en structures ressemblant à des vésicules. Ces structures portent le nom de liposomes. Les lipides cationiques sont aujourd'hui étudiés sous deux principales formes, soit : les liposomes et les émulsions lipidiques (microparticules lipidiques). Les liposomes ont été les molécules les plus étudiées parmi toutes ces molécules cationiques servant de vecteur depuis leur introduction en 1987 (El-Aneed A, 2004). La combinaison des gènes synthétiques (ADN) aux liposomes est souvent appelée lipoplexe. Les lipoplexes sont très instables (agrégation continue) et doivent être administrés dès leur synthèse. De plus, les lipoplexes possèdent une faible efficacité de transfert génique tout comme les autres vecteurs non-viraux. Une étude ayant comparé l'injection intra-

tumorale d'ADN nu codant pour l'IL-12 à l'injection intra-tumorale de liposomes contenant le gène de l'IL-12 a montré que les deux méthodes de transfert génique donnaient des résultats équivalents quant à la régression tumorale. Par ailleurs, le fait d'injecter les liposomes dans la masse tumorale permet d'éliminer la toxicité observée lors de l'administration par la voie intraveineuse de ces mêmes liposomes (Shi F, 2002). Cependant, l'efficacité de transfert génique des liposomes peut être améliorée en ajoutant des lipides neutres dans les complexes. Les lipides neutres les plus souvent utilisés à cette fin sont le cholestérol et le dioleylephosphatidylethanolamine (DOPE). L'ajout de ces lipides neutres permet aux complexes d'échapper à la destruction lysosomale (El-Aneed A, 2004).

Une autre façon d'améliorer l'efficacité de transfert génique des liposomes consiste à ajouter de la protamine lors de leur synthèse. En effet, la protamine est un peptide riche en arginine capable de condenser l'ADN chargé négativement avant qu'il ne s'organise en complexes avec les lipides cationiques. Les complexes formés par cette méthode (LPD) possèdent une taille de 3 à 5 fois plus petite que les lipoplexes puisque ces derniers capturent les gènes synthétiques entre les liposomes tandis que les LPD contiennent l'ADN à l'intérieur des liposomes (figure 7). Par ailleurs, il a été démontré par plusieurs études que l'efficacité de transfert génique des LPD était supérieure à celle des lipoplexes et cette amélioration semble être due à la taille relative plus petite des LPD comparativement aux lipoplexes

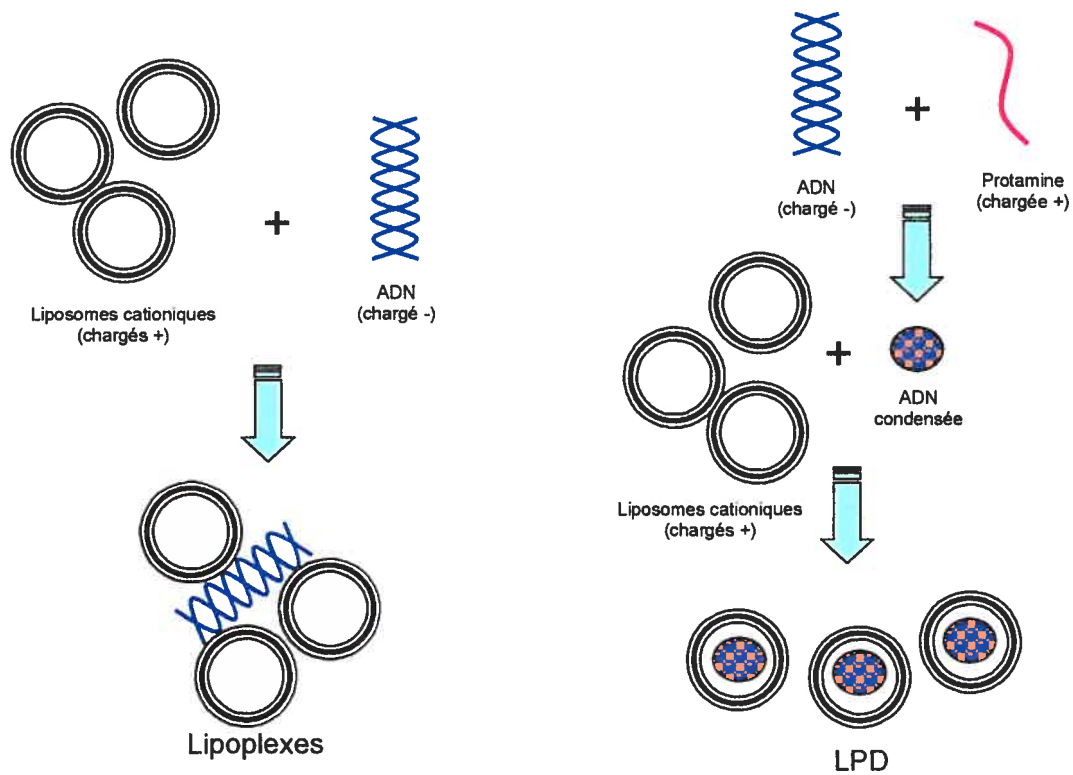


Figure 7. La création de vecteur avec des lipides cationiques. Les lipides cationiques peuvent être organisés sous deux formes de vecteur, soit: les lipoplexes et les LPD. Lors de la synthèse des lipoplexes, des liposomes chargés positivement sont mêlés aux transgènes (ADN chargée négativement). Les transgènes sont alors pris en « sandwich » entre les liposomes sous l'action de forces électrostatiques. Lors de la synthèse des LPD, la protamine est ajoutée aux liposomes et aux transgènes. En premier lieu, la protamine condense les transgènes puis l'ADN condensée est alors encapsulé dans les liposomes formant ainsi les LPD. La taille de chaque LPD devient alors de 3 à 5 fois plus petite que la taille des lipoplexes.

rendant ainsi plus facile leur endocytose et augmentant leur demi-vie dans la circulation sanguine des patients (El-Aneed A, 2004).

Par ailleurs, un autre groupe a vérifié l'hypothèse que les liposomes agissent tel un dépôt à relâchement lent du gène thérapeutique. Ce groupe a donc testé une nouvelle méthode de transfert consistant à déposer le gène synthétique thérapeutique à la surface de microparticules lipidiques au lieu de placer le gène au centre d'un liposome. Par cette nouvelle méthode, le processus d'émulsion dommageable pour l'ADN lors de la synthèse des liposomes est diminué. Les résultats ont suggéré qu'une transcription plus rapide du gène thérapeutique à l'intérieur des CPA a lieu lors de l'utilisation des microparticules lipidiques comparativement aux liposomes puisque la taille plus petite des microparticules rendrait le processus d'internalisation des CPA plus efficace (Luo Y, 2003). Par contre, ce groupe n'a effectué aucune étude comparative entre les liposomes et les microparticules. Il reste donc à vérifier cette hypothèse.

3.2.2.3 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux restent la méthode de transfert génique la plus efficace à ce jour (Galipeau J, 1999) (Thomas CE, 2003). Ils sont construits à partir de virus modulés pour transférer des gènes thérapeutiques à l'intérieur de cellules cibles. En effet, les virus sont des microorganismes acellulaires qui ont développé, au cours de leur évolution, les mécanismes les plus efficaces

pour délivrer des gènes dans les cellules qu'ils infectent. Puisque le système idéal de délivrance de gènes thérapeutiques consiste en un système efficace dépourvu d'effets secondaires néfastes (effets toxiques), les vecteurs ont été créés en supprimant le(s) gène(s) régissant le potentiel infectieux et/ou pathogénique des virus. Ces vecteurs viraux peuvent ensuite être utilisés afin de transporter des gènes thérapeutiques sans qu'une infection ou des signes de maladie virale ne se mettent en place dans les patients traités (Evans ME, 2002). Un des principaux désavantages des vecteurs viraux consiste en la taille limitée des gènes qu'ils peuvent transporter (El-Aneed A, 2004).

Un aspect intéressant de l'utilisation des vecteurs viraux pour transférer des gènes thérapeutiques pour la thérapie génique du cancer consiste en l'immunogénicité des vecteurs eux-mêmes. En effet, l'immunité cellulaire cytotoxique requise pour lutter contre le cancer est aussi le type d'immunité requise pour combattre les virus. Le fait d'utiliser des virus au matériel génétique incomplet ou absent (vecteur viral) pour délivrer les gènes thérapeutiques permet donc d'augmenter les chances de mise en place d'une immunité cellulaire cytotoxique (Ali SA, 2000). Plusieurs types de virus ont été modulés pour servir de vecteur viral tels que les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, les herpèsvirus et les poxvirus (tableau I et figure 8)

Tableau I. Les différents vecteurs viraux fréquemment utilisés en thérapie génique

Vecteurs viraux	Provenance virus	Titre (particules/mL)	Matériel génétique viral supprimé	Capacité matériel génétique synthétique	Tropisme	Expression	Immunogénéicité	Autres Avantages et/ou Désavantages
Oncorétrovecteurs	Oncorétrovirus (surtout MoMuLV)	Faible (<10 ⁷)	Gènes <i>gag</i> , <i>pol</i> & Gène <i>LTR</i> (en partie)	7 à 11kb	Tropisme très étroit	Stable (intègre la chromatine)	Peu immunogène	complément Mitose nécessaire pour intégration Mutagenèse
Lentivecteurs	Lentivirus (surtout HIV-1 et HIV-2)	Faible (<10 ⁷)	Délétion de 6 des 9 gènes viraux Gène <i>LTR</i> en partie	7 à 11kb	Tropisme très étroit	Stable (intègre la chromatine)	Peu immunogène	Mutagenèse insertiomelle
Adénovecteurs	Adénovirus (sérotypes 2 & 5)	Élevé (~10 ¹³)	Variable selon la génération utilisée	8 à 32kb (selon la génération)	Large tropisme	Transitoire (forme épisomale)	Très immunogène (moins chez la génération ne contenant aucun gène viral)	Toxiques si administrés par voie i.v. à doses élevées
Vecteurs adéno-associés (AAV)	Parvovirus humains (sérotype 2)	Élevé (~10 ¹²)	-Gènes viraux <i>rep</i> & <i>cap</i>	<5kb	ND	Transitoire	Immunogène	Utilisation sécuritaire (ne cause aucune maladie humaine)
Herpèsvecteurs	Herpèsvirus (type 1 & type 2)	Titre élevé	Délétion des 5 "immediate-early genes"	>30kb (40à150kb)	Large tropisme (tropisme fort pour cellules nerveuses)	Stable (épisode dans noyau des neurones) Transitoire (autres types cellulaires)	Peu immunogène	
Poxvecteurs	Poxvirus -Genre orthopoxvirus : vaccinia virus (Vv) et MVA -Genre avipoxvirus : fowlpoxvirus et canarypoxvirus	ND	Variable	25kb	Large tropisme (vaccinia virus seulement)	Expression élevée (promoteur très fort) Stable ou transitoire	Très immunogène	Vaccins tumoraux (réponse humorale et cellulaires fortes) Toxicité si exposition initiale à v (utiliser des souches atténuées : MVA)

Tableau I. Les différents vecteurs viraux fréquemment utilisés en thérapie génique. On peut séparer les vecteurs en 2 catégories selon la forme dans les cellules cibles que prennent les gènes qu'ils transportent. D'une part, certains vecteurs peuvent intégrer leurs gènes dans la chromatine des cellules cibles (oncovecteurs, lentivecteurs, AAV) ou d'une autre part, certains vecteurs peuvent simplement mettre leur gènes sous forme d'épisomes extrachromosomaux dans le noyau des cellules cibles (adénovecteurs, AAV, herpèsvecteurs). Si les cellules cibles ne possèdent pas un index mitotique élevé, comme par exemple les neurones, les vecteurs ne s'intégrant pas dans la chromatine des cellules cibles peuvent être utilisés. Ils peuvent aussi être très utiles si une expression transitoire du transgène est désirée. Cependant, si les cellules cibles possèdent un index mitotique élevé, les vecteurs intégrant la chromatine des cellules cibles doivent être utilisés afin de maintenir l'expression du transgène dans le patient. L'intégration du transgène n'est par contre pas une garantie à elle seule de son expression à long terme puisque d'autres mécanismes, tel le silençage, peuvent altérer l'expression d'un transgène intégré. Aussi, il est important de garder à l'esprit que l'intégration d'un transgène peut mener à la mutagenèse insertionnelle. De plus, les AAV ayant la capacité d'intégrer le génome (vecteurs ayant conservé le gène *rep*), en plus de la mutagenèse insertionnelle, peuvent mener à d'autres accidents tels que des réarrangements chromosomiques ainsi que des délétions de larges segments d'ADN à l'intérieur des chromosomes. (Brockstedt DG, 1999; Burton EA, 2002; De Palma M, 2003; Evans ME, 2002; Friedmann T, 2003; Galipeau J, 1999; Hacein-Bey-Abina S, 2003; Ishii K, 2002; Kaufman HL, 2003; Kay MA, 2001; Kwak H, 2003; Latchman DS, 2002; Misumi M, 2003; Nadeau I, 2003; Oertli D, 2002; Palmer D, 2003; Powell SK, 1999; Raper SE, 2003; St-George JA, 2003; Thomas CE, 2003)

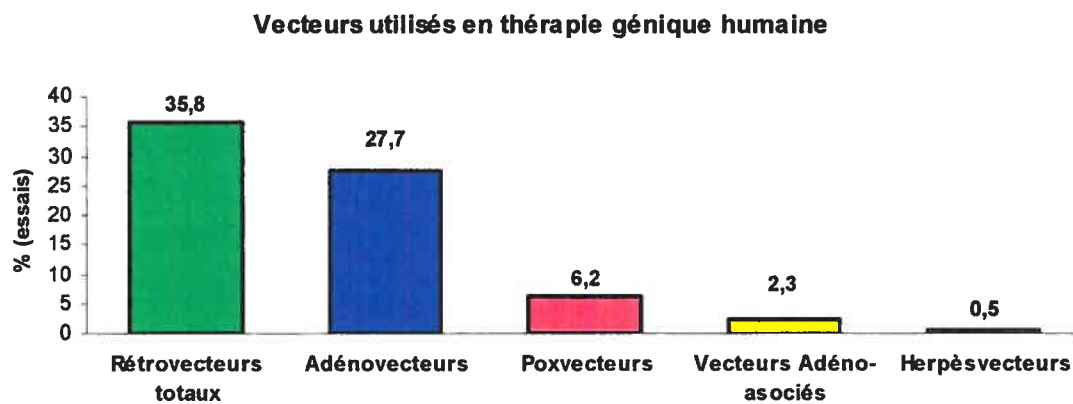


Figure 8. Histogramme des différents vecteurs viraux utilisés dans les protocoles de thérapie génique humaine. 35.8% des protocoles de thérapie génique utilisent des rétrovecteurs simples ou complexes tandis que 27.7% des protocoles utilisent des adénovecteurs, 6.2% utilisent des poxvecteurs, 2.3% utilisent des vecteurs adéno-associés et seulement 0.5% des protocoles utilisent des herpèsvecteurs.

Les oncorétrovecteurs (rétrovecteurs simples)

Les oncorétrovecteurs sont élaborés à partir des rétrovirus simples (les oncorétrovirus) qui sont de petits virus à ARN. Les oncorétrovirus intègrent leur matériel génétique dans le génome des cellules cibles. Cette caractéristique amène un risque de mutagenèse insertionnelle lors de l'utilisation des oncorétrovecteurs en thérapie génique. Cependant, selon une étude *in vitro* faite sur des cellules murines, l'insertion des oncorétrovecteurs ne mène pas plus souvent à la transformation cancéreuse des cellules transduites que le taux spontané de transformation cellulaire, taux se chiffrant à 1.1×10^{-5} (Powell SK, 1999). Par contre, un essai clinique effectué *in vivo* semble contredire ces données. En effet, des oncorétrovecteurs ont été employés pour insérer le gène codant pour la chaîne commune γ (γ_c) des récepteurs de cytokine dans des cellules de la moelle osseuse de 10 enfants SCID-X1 (déficiency en la chaîne γ_c). Malheureusement, les deux plus jeunes patients ont développé une prolifération incontrôlée de certains lymphocytes T matures (i.e. une leucémie aiguë). Cette prolifération fut associée à l'intégration du gène thérapeutique et de son promoteur près du gène *LMO2*, un gène connu pour être un facteur de transcription ayant un rôle central dans l'hématopoïèse. Cette mutagenèse insertionnelle détectée dans 20% des patients traités (2/10) avec les oncorétrovecteurs nous fait comprendre la nécessité de bien connaître le rapport risque/bénéfice associé aux nouvelles technologies développées. Ici, le bénéfice consistait à donner aux enfants

traités une possibilité de vivre normalement comparativement aux autres enfants atteints de cette maladie qui doivent rester isolés dans des tentes stériles pour survivre. Ce bénéfice valait sûrement le risque associé à la thérapie d'autant plus que la leucémie aiguë développée par les 2 enfants peut être traitée en contraste à la maladie SCID-X1 (Williams DA, 2003) (Hacein-Bey-Abina S, 2003) (Friedmann T, 2003). Notons aussi que cette même caractéristique, soit l'intégration du gène synthétique dans le génome des cellules cibles, permet une expression prolongée du gène thérapeutique synthétique dans le patient.

Trois autres désavantages liés à l'utilisation des oncorétrovecteurs peuvent être contournés en modifiant les molécules de surface du vecteur (procédé nommé pseudotypage). Ces trois désavantages sont le tropisme étroit, l'inactivation par le complément lors d'administration des oncorétrovecteurs dans la circulation sanguine et l'obtention de préparations d'oncorétrovecteurs à faible titre seulement. En effet, si l'on ajoute la molécule VSV-G (protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse) à la surface des oncorétrovecteurs, ces derniers reconnaissent alors des phospholipides membranaires (phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) retrouvés à la surface de toutes les cellules eucaryotes élargissant du même coup leur tropisme. De plus, en ajoutant VSV-G à la surface des oncorétrovecteurs, on peut procéder à plusieurs cycles de gel et dégel sans perdre l'activité initiale des vecteurs viraux, caractéristique permettant

l'entreposage prolongée des rétrovecteurs. Par ailleurs, les oncorétrovecteurs pseudotypés avec VSV-G peuvent subir une ultracentrifugation sans être inactivés (augmentation du titre) et deviennent résistants au complément (Galipeau J, 1999).

Un dernier désavantage des oncorétrovecteurs est la taille relativement petite des gènes synthétiques pouvant être transportés par eux. En effet, pas plus de 7 à 11kb de matériel génétique synthétique peut être transporté par chacun des oncorétrovecteurs.

Par ailleurs, mentionnons que les oncorétrovecteurs ne peuvent transduire que des cellules en mitose. Cette caractéristique est malheureuse puisqu'elle diminue l'efficacité de transfert génique de ces vecteurs mais bénéfique puisqu'elle confère une certaine spécificité aux vecteurs envers les cellules tumorales qui possèdent souvent un index mitotique plus élevé que les tissus sains entourant les tumeurs (El-Aneed A, 2004).

Les lentivecteurs (rétrovecteurs complexes)

Les lentivecteurs sont élaborés à partir des lentivirus, soit des rétrovirus complexes. De façon générale, ces vecteurs viraux possèdent donc les mêmes caractéristiques que les vecteurs élaborés à partir des rétrovirus simples. La principale différence entre ces deux vecteurs est que

les lentivecteurs peuvent transduire autant les cellules en mitose que celles au repos (phase G₀ dans le cycle cellulaire) (El-Aneed A, 2004).

Encore une fois, le pseudotypage est essentiel pour élargir le tropisme des lentivecteurs. En effet, les lentivecteurs dérivés de HIV-1 ne reconnaissent que les cellules portant la molécule de surface CD4 (donc surtout les lymphocytes T auxiliaires) (Evans ME, 2002). Il est aussi possible de restreindre l'expression du gène thérapeutique à un type cellulaire particulier lorsque l'on désire cibler un type très spécifique de cellules dans un protocole de thérapie génique du cancer. Dans cette optique, un groupe de chercheurs a construit un lentivecteur pseudotypé avec VSV-G dans lequel ils ont inséré le gène d'un promoteur exprimé spécifiquement dans les cellules endothéliales, soit *Tie2*. Ces lentivecteurs, une fois injecté par la voie intraveineuse dans des souris atteintes de tumeur, permettaient une expression spécifique du gène *GFP* (protéine fluorescente verte de méduse) dans les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux comparativement à d'autres lentivecteurs codant pour les promoteurs *CMV* (promoteur du cytomégalovirus) ou *PGK* (promoteur de la kinase phosphoglycérate) qui provoquaient une expression très élargie de *GFP* dans tous les types cellulaires des souris injectées (De Palma M, 2003). Un tel promoteur permet donc de cibler l'expression d'un gène thérapeutique (par exemple, un gène suicide) dans un type cellulaire spécifique. Par exemple, le promoteur *Tie2*

pourrait être employé pour réguler l'expression d'un gène suicide (ex. : *TK*) à l'intérieur de cellules d'hémangiosarcome.

Les adénovecteurs

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin qui causent des maladies bénignes des voies respiratoires supérieures chez les humains. Plus de 50% des humains possèdent des anticorps (Ac) neutralisant contre le sérotype 5. Or, les adénovecteurs sont construits à partir des sérotypes 2 ou 5 (Nadeau I, 2003). Malheureusement, ces anticorps neutralisant peuvent diminuer l'efficacité de transduction en fixant les vecteurs viraux et provoquant leur destruction avant même qu'ils ne parviennent aux cellules cibles et puissent y insérer le gène thérapeutique. Il est aussi intéressant de noter que la majorité des chiens possèdent des Ac contre l'adénovirus canin de sérotype 2 (CAV-2, adénovirus causant une maladie bénigne des voies respiratoires chez le chien) puisque nos protocoles vétérinaires de vaccination incluent l'immunisation de façon routinière contre ce virus dans le but de protéger les chiens contre CAV-1 qui cause une maladie beaucoup plus grave, soit l'hépatite infectieuse canine (Andrawiss M, 2001).

Puisque les adénovecteurs sont souvent très immunogènes (induction d'Ac neutralisant), une attention particulière est requise lorsqu'on désire les administrer plus d'une fois pour un protocole thérapeutique. En effet, les

adénovecteurs ne mènent pas à l'intégration des gènes synthétiques dans le génome des cellules transduites par ces vecteurs viraux et des anticorps neutralisant sont rapidement créés contre les protéines constituant la charpente des adénovecteurs ainsi que celles encodées par les gènes des adénovirus n'ayant pas été supprimés lors de la création des vecteurs viraux. Si plusieurs administrations sont requises afin de maintenir l'expression du gène pour une période prolongée, plusieurs solutions sont proposées dans la littérature. La solution la plus simple consiste à utiliser un autre sérotype d'adénovecteur ou un autre type de vecteur. Parmi les autres solutions, on retrouve la plasmaphorèse (i.e. enlever les Ac neutralisant du plasma du patient avant la seconde administration d'adénovecteurs, procédé qui est très peu pratique), le masquage de la surface de l'adénovecteur avec des molécules synthétiques, l'administration d'anti-inflammatoires ou d'Ac monoclonaux dirigés contre les molécules de co-stimulation en même temps que l'administration des adénovecteurs (procédés diminuant certainement les défenses naturelles du patient) ou l'introduction de gènes atténuant la réponse immunitaire dans les adénovecteurs en plus du gène thérapeutique (St-George JA, 2003).

Plusieurs générations d'adénovecteurs ont été construites, chacune variant de l'autre par les gènes supprimés du matériel génétique viral endogène afin de diminuer de plus en plus le potentiel immunogénique de ces vecteurs viraux. La première génération porte une délétion des gènes E1

et E3 et possède ainsi une capacité de clonage de 7 à 8kb (Nadeau I, 2003). La deuxième génération porte aussi une délétion des gènes E1 et E3, ainsi qu'une délétion des gènes E2a, E2b ou E4. La troisième génération est appelée « helper dependent vector », soit un vecteur dépendant d'un virus auxiliaire si l'expression est traduite textuellement. Les « helper dependent vector » sont des adénovecteurs dans lesquels tous les gènes viraux endogènes des adénovirus ont été supprimés. Pour les produire, on doit utiliser un virus auxiliaire qui possède les gènes des adénovirus. Un désavantage certain des « helper dependent vector » est que les virus auxiliaires contaminent toujours la préparation d'adénovecteurs (souvent à des pourcentages plus faibles que 0.1%) (Kay MA, 2001) (Palmer D, 2003). Notons que cette dernière génération d'adénovecteur possède une plus grande capacité de clonage (37kb) ainsi qu'une expression à plus long terme du gène car les cellules transduites n'expriment aucune protéine d'adénovirus et donc l'immunogénicité négligeable induite par ces vecteurs permet une survie plus longue des cellules transduites exprimant le gène thérapeutique (St-George JA, 2003) (Palmer D, 2003).

Un grand désavantage des adénovecteurs consiste à leur toxicité lorsqu'ils sont administrés par voie systémique à forte dose, toxicité se traduisant par la défaillance de multiples organes, par des dommages endothéliaux extensifs et/ou par une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) pouvant être fatale (St-George JA, 2003) (Raper SE, 2003).

Les vecteurs Adéno-Associés

Les vecteurs adéno-associés (AAV) sont construits à partir de parvovirus humains de sérotype 2 qui sont des virus à ADN simple brin. Au moins 85% de la population humaine possède des Ac neutralisant contre le parvovirus humain de sérotype 2 diminuant ainsi l'efficacité de transfert génique obtenue avec ces vecteurs viraux (Brockstedt DG, 1999).

L'utilisation de ces vecteurs est très sécuritaire puisque le parvovirus humain de sérotype 2 ne cause aucune maladie humaine et que le AAV requiert un virus auxiliaire (généralement un adénovirus, un herpèsvirus ou un poxvirus) pour produire une infection active (Evans ME, 2002). En effet, le matériel génétique endogène des parvovirus ne code que pour deux protéines (soit la protéine rep et celle cap) et il est entièrement supprimé lors de l'élaboration des AAV. Par contre, seulement de très petits gènes (< 5kb) peuvent être véhiculés par ces vecteurs viraux puisque la taille du matériel génétique endogène supprimée des parvovirus n'est pas très grande (El-Aneed A, 2004).

Par ailleurs, les AAV possèdent un fort potentiel immunogénique et il y a une formation d'Ac neutralisant peu importe la voie d'administration des AAV choisie, ce qui limite toute administration subséquente du même AAV (Brockstedt DG, 1999).

Les herpèsvecteurs

Les herpèsvecteurs sont produits à partir des virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) ou type 2 (HSV-2) qui sont des virus infectant les humains au niveau des muqueuses (oculaire, orale ou génitale) et causant des lésions de type lytique à ces endroits. Durant leur cycle viral, les virus herpès simplex infectent les neurones sensitifs des muqueuses lésées et ils y demeurent sous une forme latente mais non intégrée dans le génome du neurone (épisode). L'expression du gène, même s'il ne se retrouve pas intégré à l'intérieur de la chromatine des cellules cibles, est cependant stable grâce aux éléments régulateurs de la latence du virus, latence bien connue dans les maladies humaines ou animales causées par les herpèsvirus (Latchman DS, 2002). Cette latence parfois indésirable en thérapie génique ne pose pas un sérieux problème lors du traitement du cancer puisque les cellules tumorales transduites par les herpèsvecteurs expriment un gène thérapeutique menant à leur destruction.

Chaque type de virus herpès simplex (HSV-1 et HSV-2) reconnaît des récepteurs différents à la surface des cellules (Misumi M, 2003). Afin d'élargir le tropisme de ces vecteurs viraux, il est possible de les pseudotyper.

Les herpèsvecteurs sont élaborés en supprimant les gènes de certaines protéines virales exprimées habituellement tôt lors de l'infection (*ICP0*, *ICP4*, *ICP27* et *ICP22*). Ces protéines permettent la production des

autres composantes virales essentielles pour le cycle viral des virus herpès simplex. Suite aux délétions du matériel viral endogène, les herpèsvecteurs peuvent transporter des gènes synthétiques de taille aussi grande que 40kb. Cette caractéristique est très intéressante lorsque le transfert simultané de deux gènes est souhaité puisque ces gènes peuvent être insérés dans le même herpèsvecteur.

Les poxvecteurs

Les poxvecteurs sont construits à partir des poxvirus qui sont des virus à ADN double brin. Les promoteurs des poxvirus, parmi les plus efficaces de tous les promoteurs eucaryotiques, permettent une expression élevée du gène thérapeutique (Oertli D, 2002). Deux genres de poxvirus des vertébrés ont été utilisés fréquemment pour produire les poxvecteurs, soit les orthopoxvirus infectant les mammifères (desquels sont dérivés les vaccinia virus et les MVA (Modified Vaccinia Ankara)) ainsi que les avipoxvirus qui sont pathogéniques chez les oiseaux (desquels sont dérivés les fowlpoxvecteurs et les canarypoxvecteurs). Les poxvecteurs peuvent transporter des gènes de taille allant jusqu'à 25kb et possèdent donc le pouvoir de transporter plus d'un gène simultanément. Cette caractéristique se retrouve uniquement dans deux familles de vecteurs viraux, soit les herpèsvecteurs ainsi que les poxvecteurs et est très intéressante pour la thérapie génique du cancer

puisque l'action synergique de plusieurs molécules est souvent étudiée (El-Aneed A, 2004).

Les vaccinia virus possèdent un tropisme très large et sont d'ailleurs les seuls poxvecteurs à ne pas posséder un tropisme restreint. Grâce à cette caractéristique, ainsi qu'à leur immunogénicité élevée tant au niveau cellulaire qu'au niveau humoral, ce sont les vaccinia virus qui ont été choisis pour créer un vaccin servant éradiquer la « smallpox » de la surface du globe terrestre en 1984.

Par ailleurs, les poxvirus très atténués tels que MVA ne peuvent plus se répliquer (ou se répliquent très peu) dans plusieurs lignées cellulaires de mammifères et ne sont pas pathogéniques, ni chez les animaux sains, ni chez les animaux immunodéficients. Ils constituent donc des vecteurs viraux très sécuritaires et sont utilisés dans des patients qui seraient à risque de développer des effets secondaires sévères suite à l'administration de vaccinia virus (Ishii K, 2002) (Kaufman HL, 2003).

3.2.3 Avantages et inconvénients de l'immunothérapie génique

Désavantages

Le premier désavantage de l'immunothérapie génique et, sans contredit le plus important, résulte de la faible efficacité de transfert génique obtenue avec la plupart des méthodes utilisées (Wang JH, 2003). Les vecteurs viraux constituent la meilleure façon d'insérer des gènes synthétiques à l'intérieur de cellules cibles dans le patient et il est possible d'améliorer leur potentiel de transfert en modifiant certains éléments à l'intérieur des vecteurs viraux. Ces éléments sont modifiés selon l'origine des cellules à être transduites. En effet, l'oncorétrovecteur MoMLV (Moloney murine leukemia) peut mener à un taux élevé de transduction des lymphocytes T humains ainsi qu'à un taux élevé d'expression du gène *GFP* s'il est construit avec le LTR (long terminal repeat) du MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus) et avec une région non transduite améliorée en 5' comparativement aux résultats obtenus si l'oncorétrovecteur MoMLV standard est utilisé. De plus, notons qu'une efficacité de transfert plus grande des vecteurs permet de diminuer le MOI (multiplicity of infection) auquel on utilise les vecteurs et ainsi de minimiser les risques de mutagenèse insertionnelle (Engels B, 2003). L'immunothérapie génique par vecteurs viraux nécessite donc une production des vecteurs à un titre vectoriel élevé pour parvenir à une efficacité de transduction satisfaisante.

Le deuxième désavantage de la thérapie génique *in vivo* résulte du manque de spécificité des vecteurs. Cependant, le pseudotypage des vecteurs viraux et/ou l'introduction de promoteurs spécifiques à certains

types cellulaires permet d'améliorer la spécificité des vecteurs ou la spécificité de l'expression des gènes thérapeutiques utilisés. Par contre, aucune sélection *in vivo* des cellules transduites n'est possible, ni aucun ajustement de la dose de la protéine thérapeutique produite puisque son expression varie souvent relativement au type cellulaire ayant acquis le gène thérapeutique.

Finalement, la suspension de la thérapie est très ardue si des effets secondaires néfastes sont observés car les cellules transduites sont difficilement identifiables dans le patient (la transduction *in vivo* s'effectue presque toujours de façon aléatoire).

Avantages

Le plus grand avantage de l'immunothérapie génique est qu'aucune manipulation des cellules du patient n'est requise en laboratoire. Ainsi, les risques de contamination bactérienne, virale ou fongique des cellules sont diminués puisque les cellules du patient ne sont jamais manipulées en laboratoire. De plus, cela rend les protocoles de traitement moins coûteux et moins fastidieux que ceux requérant une manipulation en laboratoire des cellules du patient car ils se résument souvent à une ou plusieurs injections locales ou systémiques du gène nu ou du gène à l'intérieur d'un vecteur (molécule cationique ou vecteur viral) (Oertli D, 2002).

De plus, l'immunothérapie génique permet de diminuer la fréquence des traitements puisque la production constante des protéines thérapeutiques est assurée par les cellules du patient par opposition aux traitements où les protéines synthétiques sont injectées dans le patient et perdent leur action dès qu'elles sont détruites (demi-vies souvent très courtes).

3.3 Immunothérapie cellulaire

3.3.1 Définition

L'immunothérapie cellulaire du cancer consiste à transférer des gènes thérapeutiques à des cellules normales ou tumorales du patient en laboratoire puis à réimplanter ces cellules modifiées dans les patients pour induire une réponse immunitaire cytotoxique menant à la destruction des cellules tumorales. Les cellules peuvent être réintroduites dans la circulation sanguine du patient ou injectées à un site particulier, soit librement, soit sous la forme d'un implant en les incorporant dans une matrice la plus inerte possible.

3.3.2 Types de cellules utilisées en thérapie cellulaire

Plusieurs types de cellules peuvent être modifiées puis utilisées en thérapie cellulaire. Dans plusieurs protocoles, les cellules du patient (cellules autologues) sont utilisées pour produire la protéine thérapeutique. Ces cellules consistent soit en des cellules saines (cellules souches, fibroblastes, cellules du système immunitaire, etc.) ou en des cellules cancéreuses inactivées. Ces cellules sont prélevées, modifiées en laboratoire pour exprimer la protéine thérapeutique puis réimplantées dans le patient par voie systémique (circulation sanguine) ou locale.

Par ailleurs, certains protocoles décrivent l'utilisation de cellules hétérologues pour la thérapie cellulaire, c'est-à-dire des cellules provenant d'un animal d'une autre espèce que le patient. Les cellules hétérologues peuvent être utiles en immunothérapie cellulaire du cancer puisqu'elles permettent une activation encore plus grande du système immunitaire. En effet, le système immunitaire du patient ne reconnaît pas les cellules hétérologues implantées comme faisant partie du soi, il les perçoit comme des cellules étrangères à détruire et s'engage alors dans cette voie. Les cellules hétérologues ont donc la capacité d'attirer une forte population d'effecteurs du système immunitaire en leur proximité. Par contre, si l'expression à long terme du gène synthétique est désirée, les cellules autologues demeurent la stratégie idéale en thérapie cellulaire du cancer. Voici quelques exemples de stratégies adoptées en immunothérapie cellulaire du cancer relativement au type de cellule choisi.

3.3.2.1 Les cellules hétérologues

Une étude a démontré que la stratégie « chirurgie plus radiothérapie » dans le traitement du mélanome chez le chien et du fibrosarcome chez le chat était plus efficace lorsque des fibroblastes de singe (cellules Véro) ingénierées pour produire l'IL-2 humaine (hIL-2) étaient injectées au site d'excision de la tumeur. Ces deux types fréquents de tumeurs apparaissent spontanément chez les espèces mentionnées. Par ailleurs, ces tumeurs représentent des modèles très différents de cancer puisque le mélanome canin possède un comportement très agressif (métastases fréquentes) tandis que le fibrosarcome félin l'est beaucoup moins (métastases rares mais récurrences locales possibles). L'utilisation de cellules hétérologues permet d'augmenter l'effet antitumoral de la thérapie puisque ces cellules induisent une immunité locale non spécifique en plus de produire de l'IL-2 dans l'environnement des effecteurs du système immunitaire recrutés au site d'excision de la tumeur. La thérapie combinée (chirurgie plus radiothérapie plus cellules Véro sécrétant hIL-2) permet donc de diminuer les récurrences et d'augmenter la durée de survie des animaux atteints de ces tumeurs (Quintin-Colonna F, 1996).

Une autre étude démontre qu'une lignée cellulaire de fibroblastes (allotype H-2^k), modifiée pour exprimer de l'IL-2 humaine et utilisée en injections intra-tumorales en thérapie de gliome, de mélanome ou de

carcinome mammaire intracrâniens dans des souris (allotype H-2^b) induisait une réponse anti-tumorale. La réponse immunitaire observée était médiée par des lymphocytes CD8+, des cellules NK ainsi que des cellules LAK et permettait aux souris traitées de survivre plus longtemps après l'implantation de la tumeur intracrânienne que les souris contenues dans le groupe témoin. Le groupe témoin de souris recevait aussi des fibroblastes allogéniques mais ces derniers n'étaient pas modifiés génétiquement. L'administration de fibroblastes dans des tumeurs intracrâniennes n'a causé aucun déficit neurologique et n'avait aucun effet négatif sur la survie des souris. En effet, l'utilisation de fibroblastes allogéniques sécrétant de l'IL-2 induit une réponse immunitaire dans les tumeurs et mène à la destruction des cellules tumorales ainsi que des fibroblastes empêchant du même coup la survie prolongée des fibroblastes dans le cerveau des souris et leur prolifération. Cette destruction des fibroblastes allogéniques permet d'empêcher une possible toxicité causée par une production soutenue de l'IL-2 et d'empêcher tout déficit neurologique qui pourrait être vu si les fibroblastes proliféraient à l'intérieur de la boîte crânienne des souris (Lichter T, 2003).

3.3.2.2 Les cellules autologues saines

Plusieurs études utilisent les cellules dendritiques en guise de cellules autologues saines. L'intérêt à utiliser les cellules dendritiques en thérapie cellulaire du cancer découle du fait qu'elles sont les seules CPA capables

d'activer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs pour induire une réponse immunitaire primaire. Les cellules dendritiques sont d'ailleurs essentielles pour induire une réponse immunitaire primaire. En effet, elles possèdent une forte expression constitutive et inductible des CMH I et CMH II, expriment les molécules de co-stimulation et d'adhésion et produisent les cytokines activant les lymphocytes T (Lundqvist A, 2002).

Les cellules dendritiques peuvent être utilisées en thérapie cellulaire sans perdre leurs propriétés. Une étude démontre que des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes du sang périphérique peuvent être transduites efficacement avec un poxvecteur fortement atténué (MVA) codant pour l'Ag MUC-1 humain et la cytokine IL-2 humaine. En effet, ces cellules dendritiques modifiées expriment l'Ag MUC-1 et la cytokine IL-2, elles sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes et donc d'induire une réponse immunitaire contre l'Ag MUC-1 et elles sont aussi aptes de passer du stade immature au stade mature en présence de TNF α (cytokine requise pour la maturation des cellules dendritiques) (Trevor KT, 2001).

Par ailleurs, une étude démontre que l'injection dans la veine porte de cellules dendritiques modifiées pour exprimer la cytokine IL-12 dans un modèle murin de métastases hépatiques de carcinome du colon a permis l'induction d'une immunité antitumorale systémique menant à la régression

de la masse tumorale primaire et de ses métastases. L'importance de cette thérapie découle du fait que le carcinome colorectal est un cancer fréquent chez l'humain en Amérique du Nord, qu'il est souvent fatal et que la majorité des patients ne peuvent supporter la résection du foie, organe qui est souvent le seul à être atteint par les métastases (Sato Y, 2002).

3.3.2.3 Les cellules autologues tumorales inactivées

Des cellules tumorales irradiées ont été modifiées par un herpèsvecteur type 2 dont la réplication est déficiente et codant pour les cytokines hIL-2 ou mGM-CSF. Il a été démontré que ces cellules tumorales irradiées et modifiées mènent à la réduction de l'incidence et du taux de croissance des tumeurs lorsqu'elles sont administrées près de la tumeur mère dans des modèles murins de carcinome rénal, de mélanome ou de sarcome. Les modèles utilisés dans cette étude ont été créés en implantant 5×10^4 cellules de lignées murines de carcinome rénal, de mélanome ou de sarcome dans le flanc droit des souris. Dans le modèle murin de carcinome rénal, une incidence tumorale de seulement 20% est observée lorsque les souris sont traitées avec les cellules produisant mGM-CSF tandis qu'une incidence tumorale de 40% s'observe lorsqu'elles sont traitées avec les cellules produisant hIL-2 comparativement à une incidence tumorale de 100% dans les souris du groupe témoin (traitement des souris avec du milieu seulement). Mentionnons cependant que le traitement débute soit en même

temps que la mise en place des tumeurs dans les modèles murins ou seulement 3 jours après celle-ci. En contraste, les tumeurs que l'on désire traiter chez l'humain sont détectées plusieurs jours et même plusieurs mois après leur apparition. Cette différence met en doute l'efficacité de cette thérapie si elle était appliquée chez des humains atteints de carcinome rénal, de mélanome ou de sarcome (Ali SA, 2000).

L'introduction du gène codant pour la cytokine GM-CSF dans des cellules murines de mélanome irradiées suivie de l'injection sous-cutanée de ces cellules modifiées sous forme de vaccin mène à l'induction d'une réponse antitumorale cellulaire et humorale dans des souris. De plus, cette immunité mène à la nécrose extensive des métastases distantes sans aucune toxicité significative. Un essai clinique de cette thérapie sur des patients humains atteints de mélanomes avec métastases montre que la stratégie mène à l'induction d'une immunité antitumorale. De façon plus spécifique, la stratégie adoptée était de prélever des mélanomes des patients, de mettre les cellules tumorales en culture, de les modifier avec un rétrovecteur codant pour hGM-CSF et de les irradier. Ensuite, des injections sous-cutanées et intradermiques avec ces cellules autologues de mélanome sécrétant la cytokine hGM-CSF étaient effectuées chez les patients. Suite à la vaccination, 11 patients sur 16 ont montré une infiltration des métastases par des lymphocytes B et T, une nécrose tumorale extensive (>80%) de ces métastases ainsi que de la fibrose et de l'œdème au sein des métastases.

De plus, un titre élevé d'anticorps reconnaissant les antigènes associés aux mélanomes a été mesuré chez les patients suite à la vaccination. Par contre, la plupart des patients traités sont décédés suite à la progression des tumeurs. Les auteurs suggèrent l'implication de la molécule CTLA-4 dans l'échec de la stratégie à protéger les patients contre la progression de la maladie. La molécule CTLA-4 est une molécule de surface portée par les lymphocytes T et elle provoque l'apoptose des lymphocytes T lorsqu'elle est activée (Dranoff G, 2003).

3.3.3. Les voies d'administration des cellules modifiées

En plus du type cellulaire, la voie d'administration des cellules modifiées est un autre paramètre à déterminer dans un protocole d'immunothérapie cellulaire du cancer. De nombreuses voies existent. Parmi celles-ci se retrouvent la voie systémique (intraveineuse ou intra artérielle), l'administration locale (souvent sous-cutanée près de la tumeur ou intra-tumorale) ainsi que l'administration locale sous forme d'implant.

Lors de l'administration des cellules modifiées par voie systémique, les cellules doivent trouver un environnement favorable à leur survie et s'y installer pour que la thérapie cellulaire soit efficace. Le plus grand inconvénient de l'administration systémique des cellules modifiées *in vitro* est que ces cellules doivent trouver un moyen pour passer à travers la barrière

endothéliale des vaisseaux afin d'aller s'installer dans un tissu adéquat pour leur survie. Or, très peu de types cellulaires ont une telle capacité de diapédèse et peu de types cellulaires ont la capacité de survivre longtemps dans un environnement liquide (sang) alors qu'elles ont été préalablement multipliées et sélectionnées sur un support solide (plats de pétri) (Daga A, 2002). De plus, les cellules injectées dans la circulation sanguine se dispersent amenant souvent des concentrations suboptimales du gène thérapeutique là où il est requis, c'est-à-dire près de la masse tumorale.

L'administration locale de cellules modifiées semble être une stratégie plus efficace que l'administration par la voie systémique ou l'administration locale en un site éloigné de l'endroit où se situe la tumeur à éliminer. Des chercheurs ont démontré qu'un protocole de vaccination fait avec des cellules tumorales irradiées et modifiées pour exprimer hIL-2 ou mGM-CSF était plus efficace lorsque les cellules étaient administrées près de la tumeur primaire que lorsqu'elles étaient administrées sur le flanc opposé de la souris. Les vaccins administrés près de la tumeur primaire retardaient sa croissance et étaient très efficaces (seulement 20% des souris portaient une tumeur 70 jours après l'implantation de la tumeur et la vaccination à un site adjacent) tandis que les vaccins administrés dans le flanc opposé avaient une efficacité beaucoup plus faible (80% des souris portaient une tumeur 70 jours après l'implantation de la tumeur et la vaccination dans le flanc opposé) (Ali Sa, 2000).

Finalement, l'administration locale des cellules modifiées dans une unité immunoisolante (capsule, fibre creuse, etc.) perméable aux échanges de molécules de petite taille (nutriments, oxygène, déchets métaboliques, protéine thérapeutique, etc.) semble être la stratégie idéale à adopter lorsqu'une expression à long terme du gène thérapeutique est désirée. Le fait d'implanter les cellules dans une telle unité semble augmenter leur temps de survie une fois qu'elles sont administrées dans le patient. Certains chercheurs croient que ces unités miment plus adéquatement la niche physiologique des cellules modifiées *in vitro* (Daga A, 2002).

Par ailleurs, les cellules administrées à l'intérieur d'unités immunoisolantes sont plus à l'abri du système immunitaire et d'une destruction prématurée par ce dernier que les cellules administrées librement. Trois mécanismes sont responsables de la destruction des cellules modifiées allogéniques ou xénogéniques soit, l'inflammation aigue, la capture par les cellules du système immunitaire du patient des peptides immunogéniques relâchés par les cellules modifiées et le contact des CMH des cellules modifiées avec les cellules du système immunitaire du patient. L'insertion des cellules modifiées à l'intérieur d'une unité immunoisolante permet de contrer l'inflammation aigue ainsi que le contact des CMH des cellules modifiées avec les cellules immunitaires du patient en créant une barrière entre les cellules modifiées et celles du patient. Par ailleurs, les peptides produits par les cellules modifiées sont très peu immunogéniques lorsque des cellules allogéniques sont utilisées pour délivrer la protéine

thérapeutique. L'insertion des cellules modifiées allogéniques dans une unité immunoisolante permet donc de prolonger leur survie dans le patient (Gray DWR, 2001). En plus de créer une barrière entre les cellules immunitaires du patient et les cellules modifiées, l'unité peut contenir une matrice (collagène ou autre) qui permet un support et une croissance adéquate des cellules modifiées tout en minimisant leur nécrose (et la réaction inflammatoire y étant associée). L'expression de la protéine thérapeutique est alors maintenue sur une période plus longue que lorsque les cellules modifiées sont insérées sans matrice à l'intérieur des unités immunoisolantes (Schneider BL, 2003) (Leoni L, 2004).

3.3.4 Avantages et inconvénients de l'immunothérapie cellulaire

Désavantages

Les principaux désavantages de l'immunothérapie cellulaire sont reliés aux manipulations des cellules requises en laboratoire. La création d'une lignée cellulaire tumorale autologue pouvant être modifiée *in vitro* est une étape ardue de la thérapie cellulaire (Ali SA, 2000) (Smith CL, 2002). Cependant que le but ultime de la thérapie génique du cancer consiste à stimuler le système immunitaire contre les cellules tumorales et toute réponse immunitaire, qu'elle soit spécifique ou non, peut être valable si elle contribue à la mort des cellules tumorales. Pour ces raisons, certains chercheurs

explorent la thérapie génique du cancer en utilisant des cellules allogéniques ou xénogéniques (donc hétérologues) comme véhicule pour transporter le gène thérapeutique (Quintin-Colonna F, 1996). De plus, la manipulation des cellules *in vitro* doit se faire de façon rigoureuse afin de minimiser les contaminations microbiennes (surtout celles bactériennes). Finalement, la culture cellulaire allonge les protocoles et rend les thérapies cellulaires très coûteuses.

Avantages

La thérapie cellulaire comporte d'importants avantages. En effet, elle permet la sélection des cellules qui seront administrées aux patients, et par le fait même, la modulation de la dose thérapeutique donnée. De plus, lorsque les cellules sont administrées sous forme d'implant, il est possible de limiter les effets secondaires non souhaités en retirant l'implant du patient.

3.4 Les gènes utilisés en immunothérapie génique et cellulaire du cancer

De nombreux gènes sont testés en immunothérapie génique et/ou cellulaire du cancer. Parmi eux, se retrouvent les gènes codant pour les antigènes associés aux tumeurs (AAT), les superantigènes, les molécules de co-stimulation et d'adhésion, les interférons, les interleukines et les

facteurs stimulants de colonies (CSF). Voici une description de ces gènes ainsi que quelques exemples pour chacun d'eux.

3.4.1 Les antigènes associés aux tumeurs (AAT)

Les AAT sont des antigènes associés aux tumeurs, c'est-à-dire des antigènes retrouvés de façon prédominante sur les cellules tumorales. Leur expression ne se limite cependant pas aux cellules tumorales et les cellules saines peuvent les exprimer, quoi qu'à des proportions habituellement moindres. La plupart des Ag tumoraux recensés dans la littérature sont des Ag restreints aux CMH I, c'est-à-dire qu'ils sont portés à la surface des cellules saines, tumorales ou des CPA par un CMH I (voir tableau II). Depuis quelques années, les Ag tumoraux restreints aux CMH II sont de plus en plus recherchés. Ces Ag ne se retrouvent donc qu'à la surface des CPA portés par des CHM II et servent à induire une réponse immunitaire cytotoxique en permettant l'activation subséquente des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes T CD8+, des CPA, des cellules NK et des cellules LAK. Un autre type d'Ag tumoraux moins étudié pour la thérapie du cancer consiste aux Ag exprimés qu'à la surface des cellules cancéreuses, Ag dits spécifiques aux tumeurs (TSA). Ces derniers n'ont cependant pas un grand intérêt en thérapie du cancer puisqu'ils peuvent induire une réponse immunitaire que contre la tumeur de laquelle ils proviennent (Renkvist N, 2001).

Tableau II. Les différents antigènes tumoraux connus	
Ag des testicules et cancers (restreints au CMH type I)	
MAGE (MAGE-A1 à MAGE-A12) BAGE DAM (DAM-6 et DAM-10) GAGE (GAGE-1 à GAGE-8) NA88-A NY-ESO (NY-ESO-1 et NY-ESO-1a)	Tous ces Ag sont exprimés sur les spermatoocytes normaux et/ou sur les spermatogonies et parfois dans le placenta ou sur les ovaires sains. Par ailleurs, ils sont exprimés dans plusieurs tumeurs humaines
Ag des mélanocytes (restreints au CMH type I)	
MART-1/Melan-A MC1R Gp100 PSA PSM Tyrosinase TRP (TRP-1 et TRP-2)	Ces Ag sont exprimés seulement dans les cellules saines ou tumorales de la lignée contenant les mélanocytes (mélanocytes, kératinocytes, cellules rétinienne et cellules nerveuses périphériques) ainsi que dans les cellules saines de la prostate
Ag communs (restreints au CMH type I)	
ART-4 CAMEL CAE Cyp-B HER2/neu hTERT hTRT iCE MUC (MUC1 et MUC2) PRAME P15 RU (RU1 et RU2) SART (SART-1 et SART-3) WT1	Ces Ag sont exprimés dans les tissus sains ainsi que dans différents types de tumeurs n'ayant aucun lien entre eux.
Ag spécifiques aux tumeurs (restreints au CMH type I)	
α -FP β -Catenin/m Caspase-8/m CDK-4/m ELF2 M GnT-V G250 HSP70-2M HA-A*0201-R170I HST-2 KIAA0205 MUM (MUM-1 à MUM-3) Myosin/m	Ces Ag proviennent de gènes normaux ayant subi des mutations ponctuelles, mutations menant à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses ou menant à la progression d'un stade cancéreux. Ces Ag ne sont exprimés que par des cellules cancéreuses, et rarement on les retrouve dans deux tumeurs différentes.

RAGE SART-2 TRP-2/INT2	
Ag (restreints CMH type II)	
Annexin II Gp100 MAGE (MAGE-1, -2, -3, -6) MART-1/Melan-A MUC1 NY-ESO-1 PSA Tyrosinase HPV-E7 CDC27/m TPI/m	Ces Ag sont reconnus par les lymphocytes T CD4+ et permettent une activation de ceux-ci

Tableau II. Les différents antigènes tumoraux connus. Toutes ces catégories d'Ag, excepté les Ag spécifiques aux tumeurs, comprennent des Ag associés aux tumeurs (AAT), c'est-à-dire des Ag retrouvés sur les cellules cancéreuses ainsi que sur les cellules saines, mais à une proportion moindre. L'allèle des CMH liant ces Ag, la séquence des épitopes de ces Ag, leur distribution tissulaire ainsi que les articles faisant référence à ces Ag sont disponibles dans l'article de Renkvist N, 2001.

Plusieurs études ont testé l'efficacité des AAT en thérapie du cancer. Dans une étude ayant pour but d'éliminer des mélanomes chez des humains atteint de mélanomes récurrents et/ou de mélanomes de grade avancé (grade III ou IV), des chercheurs ont administré des poxvecteurs codant simultanément pour les épitopes immunodominant des antigènes Melan-A, gp100 & tyrosinase (des Ag spécifiques aux mélanomes). Le fait d'utiliser des vecteurs portant les gènes pour trois épitopes immunodominant permet de contourner le mécanisme d'évasion des tumeurs consistant à diminuer l'expression d'un Ag tumoral à la surface des cellules tumorales. De plus, les poxvecteurs portaient les gènes des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2, gènes permettant de diriger le système immunitaire vers l'induction d'effecteurs plutôt que vers un statut de tolérance (Oertli D, 2002).

L'antigène CEA (carcinoembryonic antigen) est souvent utilisé dans des protocoles de thérapie génique contre les cancers du colon. Une équipe de chercheurs a placé le gène codant pour l'antigène CEA à la surface de microparticules cationiques. Ensuite, les chercheurs ont injecté ces microparticules dans les muscles de souris. Ces souris immunisées ont finalement reçu une dose létale de cellules de carcinome du colon exprimant l'antigène CEA et la réponse immunitaire induite contre ces cellules dans les souris a été analysée. Ils ont constaté que les vaccins tumoraux codant pour CEA ont induit une immunité protégeant les souris contre la dose létale de cellules tumorales (Luo Y, 2003).

Bien que l'utilisation des AAT en thérapie génique semble être prometteuse, chaque tumeur possède son éventail particulier d'antigènes spécifiques et un traitement adapté à chaque patient est souvent requis.

3.4.2 Les superantigènes

Les superantigènes sont des protéines microbiennes ayant une structure unique qui leur permet de se lier au CMH II des CPA et au TCR des lymphocytes T sans se fixer aux régions hautement spécifiques aux Ag de ces deux molécules. Les superantigènes peuvent donc déclencher un signal par l'entremise du TCR dans le lymphocyte T en absence d'un épitope spécifique au TCR généralement essentiel pour une telle réponse. En effet, les superantigènes sont des Ag non spécifiques qui peuvent activer plusieurs lymphocytes (environ 20% des lymphocytes T totaux) peu importe le TCR qu'ils expriment à leur surface. Les lymphocytes T activés par un superantigène se multiplient, produisent de nombreuses cytokines et acquièrent un pouvoir cytolytique plus grand (figure 9) (Tizard IR, 2000).

Parmi les superantigènes utilisés en thérapie génique du cancer, notons SEA (*Staphylococcus aureus* enterotoxin A) et SEB (*Staphylococcus aureus* enterotoxin B) ayant amené des taux de réponse de 25% et 46% respectivement dans des protocoles de thérapie génique de sarcomes des tissus mous et de mélanomes chez des chiens lorsque la thérapie

développée comprenait l'utilisation des gènes de cytokines telles que IL-2 ou GM-CSF (Thamm DH, 2003).

3.4.3 Les molécules de co-stimulation et d'adhésion

Les molécules de co-stimulation et d'adhésion sont des molécules de surface essentielles à l'activation des lymphocytes naïfs lorsque ceux-ci rencontrent pour la première fois un antigène. Ces molécules sont exprimées à la surface des lymphocytes et des CPA et se connectent entre elles sous forme de paires. De façon générale, l'absence d'interactions entre ces récepteurs lorsqu'il y a présence d'un antigène sur le TCR du lymphocyte naïf mène à l'anergie du lymphocyte (figure 10).

Un groupe de chercheurs a émis l'hypothèse que le système immunitaire pourrait ne pas reconnaître les cellules tumorales à cause de leur incapacité à exprimer les molécules de co-stimulation et d'adhésion. Ils ont donc modifié des cellules tumorales de cancer du sein afin qu'elles expriment les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) à leur surface puis ils ont analysé la capacité de ces cellules tumorales modifiées à stimuler les lymphocytes *in vitro*. Ils ont découvert que les cellules tumorales modifiées pour exprimer B7-1 induisaient une prolifération 7 fois plus grande des lymphocytes comparativement aux cellules tumorales n'exprimant pas B7-1 et que celles exprimant B7-2 induisaient une prolifération 5 fois plus grande

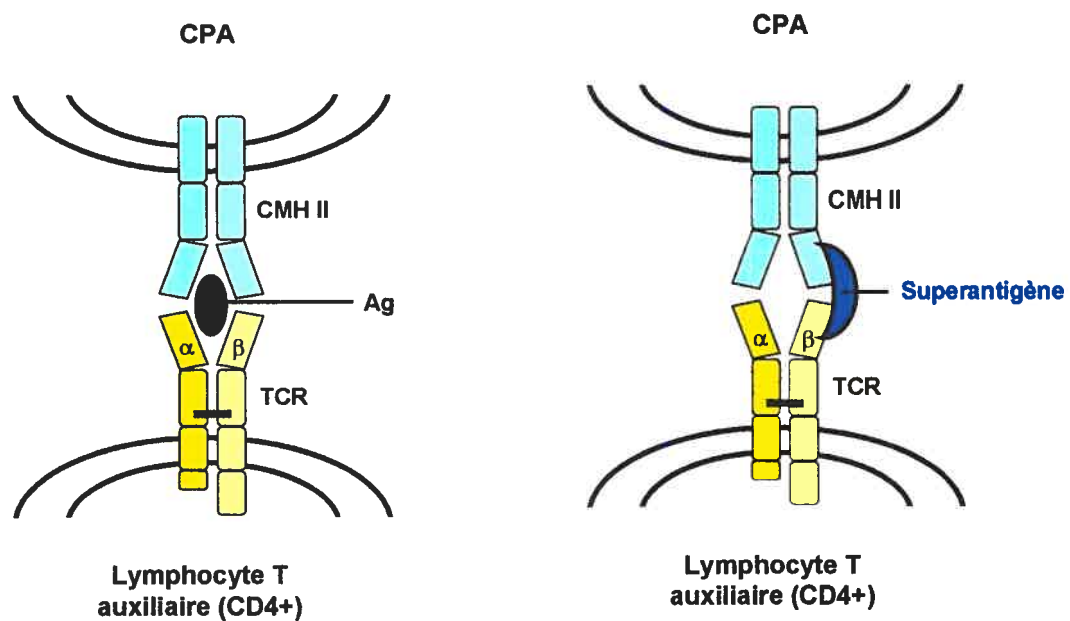


Figure 9. Différence entre la liaison d'un Ag conventionnel et d'un superantigène à un TCR. L'Ag conventionnel se fixe dans le sillon du TCR formé entre les domaines variables des chaînes α et β tandis que le superantigène se lie seulement à la région variable de la chaîne β . L'Ag conventionnel est très spécifique au TCR et reconnaît environ un TCR sur 10 000 tandis que le superantigène est beaucoup moins spécifique et est capable de reconnaître un TCR sur 5. Les superantigènes peuvent mener à l'expression et à la sécrétion de grandes quantités de cytokines (IL-2, IL-4, IL-1 et $\text{TNF}\alpha$) et produire un symptôme nommé « syndrome du choc toxique » (Tizard IR, 2000).

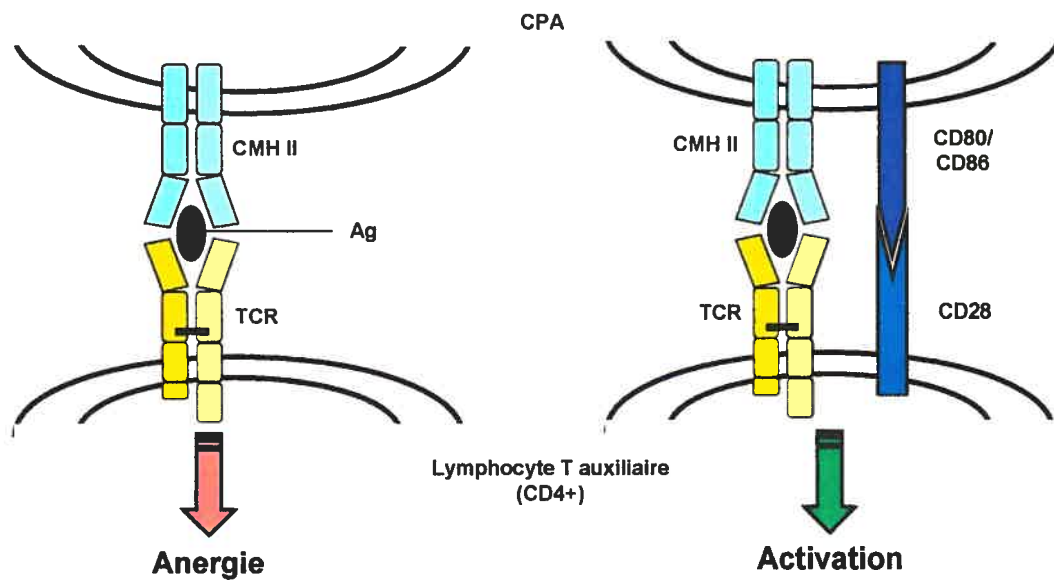


Figure 10. Les molécules de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes. Une fois que l'Ag porté par le CMH type II est lié au TCR, un deuxième signal doit provenir de la liaison entre les molécules de co-stimulation (CD80 ou CD86 sur le CPA et CD28 sur le lymphocyte T auxiliaire) pour permettre l'activation du lymphocyte (schéma de droite). Dans le cas où ce deuxième signal est absent, le lymphocyte T auxiliaire devient anergique (schéma de gauche) (Tizard IR, 2000).

modifiées pour exprimer les molécules de co-stimulation pourraient donc stimuler directement les lymphocytes T cytotoxiques et, du même coup, induire une immunité cellulaire cytotoxique lorsque les tumeurs ne semblent pas être immunogéniques (Whitley EM, 2002)

3.4.4 Les interférons (IFN)

Les interférons sont des cytokines (hormones glycoprotéiques de faible poids moléculaire soit de 20 à 34kDa) se divisant en deux principales catégories. La première catégorie regroupe entre autres les IFN alpha et bêta. Ces IFN sont produits par des cellules infectées par des virus et ils peuvent inhiber la réplication virale en interférant avec la synthèse de l'ARN et des protéines virales. La deuxième catégorie contient seulement l'IFN γ , interféron qui constitue un élément important de l'immunité cellulaire cytotoxique puisqu'il est produit par les lymphocytes CD4+ (Th1) activés et qu'il active les macrophages, les lymphocytes T et B et les cellules NK (figure 11) (Tizard IR, 2000).

Onze patients humains atteints de mélanome récurrent ou de mélanome de stade avancé ont reçu des injections intra-tumorales d'adénovecteurs codant pour l'IFN γ . Chez cinq d'entre eux, les chercheurs ont observé de l'érythème au site d'injection ainsi qu'une faible diminution de la taille des mélanomes injectés. Suite à cette étude, les chercheurs ont conclu que le traitement des mélanomes malins par injection intra-tumorale

d'adénovecteurs codant pour l'IFN γ est sécuritaire et assez bien toléré mais que ce traitement ne semble pas être très intéressant du point de vue thérapeutique selon la posologie testée. Les chercheurs suggèrent donc de modifier la dose ou la fréquence du traitement, ou encore, de combiner l'IFN γ à d'autres cytokines afin d'augmenter le potentiel thérapeutique de ce dernier (Khorana AA, 2003).

3.4.5 Les interleukines (IL)

Les interleukines sont des cytokines produites par les leucocytes permettant la prolifération et la différenciation de ces derniers. Parmi la multitude d'interleukines connues, deux sont particulièrement utilisées en thérapie génique du cancer soit l'IL-2 et l'IL-15.

L'IL-2 et l'IL-15 se lient à des récepteurs partageant une constitution pratiquement semblable puisqu'ils sont constitués de chaînes β et γ_c identiques. Seule la chaîne α est spécifique à l'interleukine reconnue par le récepteur (figure 12). Ces deux cytokines utilisent aussi les mêmes voies de signalisation intracellulaire soit Jak1/Jak3 et STAT5 (Waldmann TA, 2003). De plus, les deux cytokines agissent comme facteur de croissance pour les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK et elles permettent la génération des cellules LAK. L'IL-2 est aussi capable de stimuler la croissance des macrophages. Une de leur principale différence réside dans

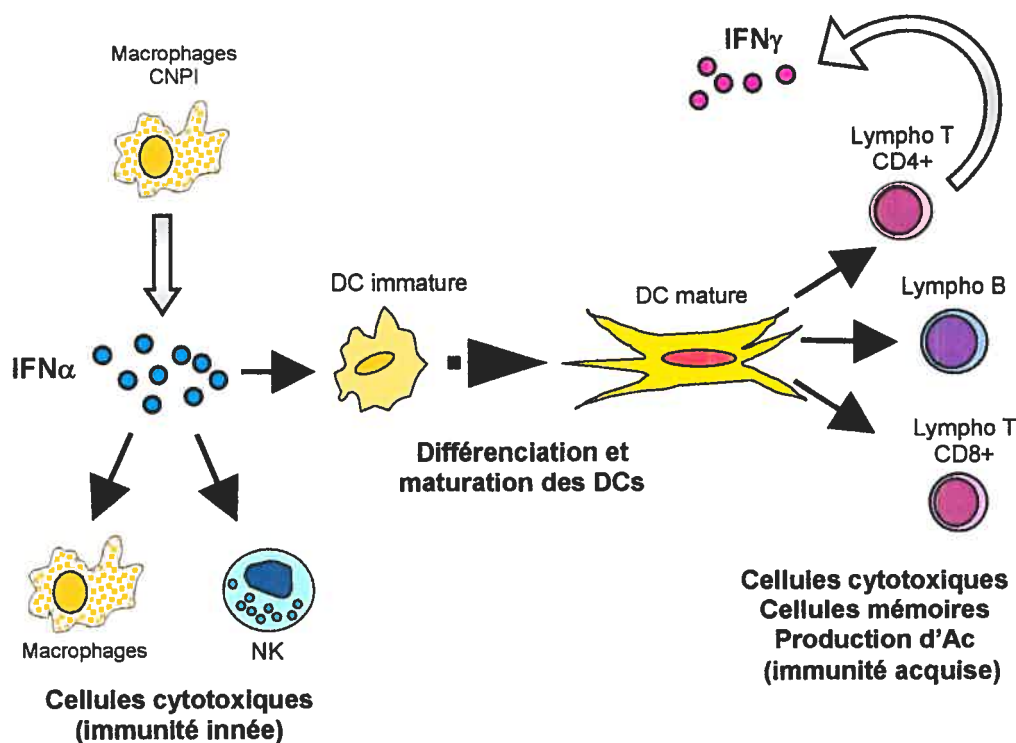
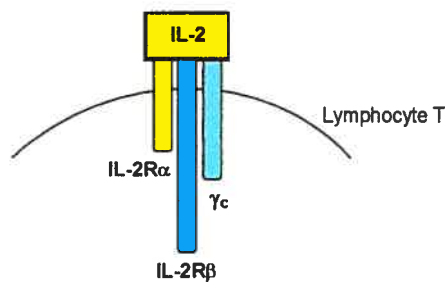


Figure 11. Rôle des Interférons (IFNs) dans l'immunité cytotoxique. L'IFN α est produite par les cellules de l'immunité innée infectées par des virus, soit les macrophages et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (aussi connues sous le nom de cellules naturelles productrices d'IFN (CNPI)). L'IFN α active les cellules cytotoxiques de l'immunité innée, soit les macrophages et les cellules NK. Ces cellules cytotoxiques détruisent les cellules cibles et créent ainsi un relâchement important d'Ag dans l'environnement. Les cellules dendritiques contenues dans cet environnement, et activées par l'IFN α , peuvent alors capter ces Ag et se rendre aux nœuds lymphatiques périphériques où se retrouvent les cellules de l'immunité acquise, soit les lymphocytes T et B. La combinaison des cellules dendritiques matures présentant des Ag avec la présence de l'IFN α dans l'environnement des lymphocytes permet de mettre en place l'immunité cellulaire et humorale nécessaires pour la destruction des cellules cibles ainsi que la prolifération et la survie des lymphocytes mémoires. De plus, les lymphocytes T CD4+ activés relâchent de l'IFN γ , soit un interféron jouant un rôle très important dans la mise en place de l'immunité cellulaire cytotoxique et permettant d'activer encore plus les macrophages, les lymphocytes (B et T) ainsi que les cellules NK.

leur origine, l'IL-15 étant produite par les CPA et l'IL-2 étant produite par les lymphocytes CD4+ (Th1) (Tizard IR, 2000) (Oh S, 2003). De plus, l'IL-2 est étroitement impliquée dans un phénomène de destruction des lymphocytes T reconnaissant des Ag du soi (un phénomène appelé activation-induced cell death (AICD) dans la littérature), phénomène visant à contrôler les maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, l'anémie hémolytique, etc. L'IL-2 permet aussi la survie des lymphocytes T suppresseurs (CD4+ CD25+). Quant à elle, l'IL-15 inhibe le phénomène nommé AICD (phénomène induit par l'IL-2) et elle permet la survie des lymphocytes T mémoire (Waldmann TA, 2003) (Fehniger TA, 2002).

À cause de ses fonctions spécifiques (inhibition de l'AICD et maintien des lymphocytes T mémoire), certains auteurs suggèrent que l'IL-15 pourrait être plus appropriée en thérapie du cancer comparativement à l'IL-2. En promouvant la prolifération des lymphocytes T et B et des cellules NK, en permettant l'activation des cellules LAK, en empêchant la destruction des lymphocytes reconnaissant les AAT (considérés comme des Ag du soi) et en permettant la survie des lymphocytes T mémoire, l'IL-15 possède de nombreux avantages souhaités en immunothérapie du cancer (Waldmann TA, 2003). En effet, un groupe de chercheurs a récemment démontré que l'IL-15 était capable d'induire une immunité cellulaire à long terme comparativement à l'IL-2 qui ne possède pas ce pouvoir. Des souris co-immunisées avec un vecteur codant pour gp-160 (épitope immunostimulant de HIV-1) et un codant

a) Récepteur d'IL-2



b) Récepteur d'IL-15

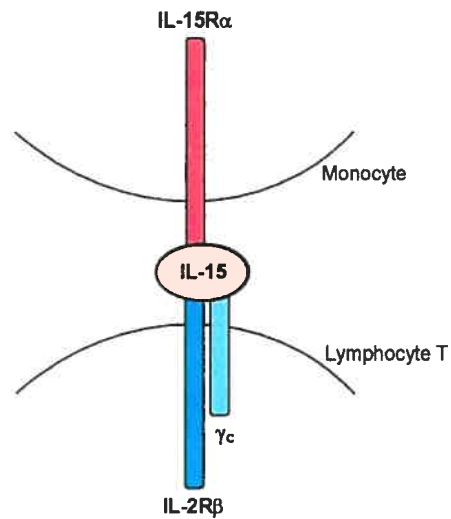


Figure 12. La structure des récepteurs d'IL-2 (haute affinité) et IL-15. Le récepteur d'IL-2 (haute affinité) est un hétérotrimère formé de trois chaînes toutes situées sur le lymphocyte T soit: la chaîne IL-2R α (chaîne spécifique à l'IL-2), la chaîne IL-2R β et la chaîne γ_c (chaîne commune qui est présente dans le récepteur de plusieurs interleukines soit IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21). Le récepteur d'IL-15 est aussi formé de trois chaînes mais deux d'entre elles sont situées sur le lymphocytes T et sont identiques aux chaînes constituant le récepteur de l'IL-2 (chaînes IL-2R β et chaîne γ_c) tandis que la troisième chaîne, spécifique à l'IL-15, est située sur les monocytes et les cellules dendritiques (IL-15R α). Les monocytes et les cellules dendritiques expriment la chaîne IL-15R α suite à une stimulation par les interférons et cette chaîne est présentée en *trans* aux cellules NK (non-montré) et aux lymphocytes T exprimant les deux autres chaînes du récepteur (Adapté de Waldmann TA, 2003) (Info sur γ_c : Habib TH, 2003).

pour IL-15 montrent des lymphocytes CD8+ spécifiques à gp-160 jusqu'à 14 mois après leur immunisation tandis que les souris co-immunisées avec un vecteur codant pour gp-160 et un codant pour IL-2 ne montrent des lymphocytes CD8+ spécifiques à gp-160 que durant une période de 2 à 4 mois après leur immunisation (Oh S, 2003).

Plusieurs chercheurs ont testé l'action de l'IL-2 contre diverses tumeurs. Les premières études consistaient à injecter la cytokine synthétique directement dans la circulation sanguine. Quoique cette méthode ait donné des résultats encourageants en immunothérapie de carcinomes rénaux et de mélanomes, la méthode est actuellement révisée à cause d'effets toxiques systémiques sévères associés aux trop fortes concentrations nécessaires pour observer une régression des masses tumorales (Rosenberg SA, 2001).

De nouveaux protocoles sont aujourd'hui testés, protocoles de thérapie génique où le gène de l'IL-2 est transféré *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules du patient ou dans des cellules étrangères. Ces nouveaux protocoles permettent de localiser l'IL-2 et du même coup de minimiser les effets toxiques associés à son administration systémique. Un groupe de chercheurs a modifié des fibroblastes de singe afin qu'ils expriment la protéine hIL-2, puis a implanté ces fibroblastes dans des patients canins et félins ayant été préalablement traités par chirurgie et radiothérapie. Ces chercheurs ont démontré que les chiens atteints de mélanomes et les chats atteints de fibrosarcomes connaissaient moins de rechutes et survivaient plus longtemps

lorsque leur thérapie comprenait l'implantation de fibroblastes sécrétant l'IL-2 humaine que lorsqu'ils n'étaient traités que par chirurgie et radiothérapie. De plus, l'utilisation de cellules étrangères (fibroblastes de singe), donc histoincompatibles, permettrait d'induire une forte réponse antitumorale menant à l'inhibition de la croissance de la tumeur ou à la destruction cette dernière par le système immunitaire (Quintin-Colonna F, 1996).

Par ailleurs, un autre groupe a testé le potentiel immunogénique de vaccins créés avec des cellules murines de carcinome rénal, de mélanome ou de sarcome irradiées et modifiées pour qu'elles expriment hIL-2. Ils ont fait la surprenante découverte que les cellules murines tumorales irradiées sécrétaient des niveaux plus élevés d'IL-2 humaine que les cellules tumorales murines modifiées mais non irradiées. Ces vaccins protégeaient plus de 90% des souris vaccinées (Ali Sa, 2000).

Une autre interleukine souvent utilisée dans les protocoles de thérapie génique du cancer est l'IL-12, une interleukine composée de deux sous-unités (p35 et p40) toutes deux essentielles à son activité biologique. L'IL-12 est produite par les CPA (surtout les cellules dendritiques) et elle exerce de multiples fonctions antitumorales telles que l'activation des cellules NK, des NK-T et des lymphocytes T les menant ainsi à produire de l'IFN γ . De plus, elle possède un effet anti-angiogénique qui limite l'apparition des métastases (Smyth MJ, 2002) (Sato Y, 2002). Plus spécifiquement, l'IL-12 active STAT4 (un

facteur de transcription) qui permet la différenciation des lymphocytes T auxiliaires en sous-type Th1 et dirige donc la réponse immunitaire vers l'immunité cellulaire cytotoxique (Athie-Morales V, 2004) (Kimura Y, 2003).

Une étude démontre une régression de 87% d'adénocarcinomes murins traités avec le gène d'IL-12. Dans cette étude, les tumeurs étaient implantées dans le derme de la peau des souris et étaient, par la suite, injectées avec des plasmides codant pour mL-12 ou des complexes de liposomes codant pour mL-12. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux stratégies, tant au niveau de l'expression du gène, de la production d'IFN γ (cytokine produite par les Th1 sous l'effet de l'IL-12), de la génération des lymphocytes cytotoxiques ou de la génération des lymphocytes mémoires. De plus, aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'efficacité *in vivo* (régression des masses tumorales et survie des souris traitées) entre les deux stratégies (Shi F, 2002).

Par ailleurs, une autre étude a montré que des cellules dendritiques modifiées pour exprimer mL-12 et administrées par la veine porte pouvaient diminuer la croissance de métastases d'adénocarcinome colorectal établies dans le foie dans un modèle murin (Satoh Y, 2002).

Finalement, certains chercheurs étudient depuis peu la cytokine IL-21 en thérapie du cancer. Brièvement, cette cytokine permet de d'inhiber la croissance de plusieurs tumeurs solides grâce à son effet sur les effecteurs

cytolytiques (CTL et cellules NK). De plus, cette l'action antitumorale de l'IL-21 est indépendante de la cytokine IFN γ , cytokine associée à de nombreux effets secondaires sévères et produite dans plusieurs réponses antitumorales. Par ailleurs, l'IL-21 ne semble pas induire d'effets secondaires systémiques dangereux suite à son administration systémique comme ceux rencontrés lors de l'administration systémique de l'IL-2 (Habib TH, 2003).

3.4.6 Les facteurs stimulants de colonies (CSF)

Les facteurs stimulant de colonies sont des cytokines produites par différents types cellulaires (macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales et/ou fibroblastes) agissant comme facteur de croissance sur les progéniteurs de granulocytes (G-CSF), les progéniteurs de monocytes (M-CSF) ou sur les progéniteurs myéloïdes (GM-CSF) (Tizard IR, 2000).

Plusieurs équipes de chercheurs utilisent le gène de GM-CSF, seul ou en combinaison avec d'autres cytokines, dans leurs protocoles de thérapie génique du cancer. Entre autre, une équipe a testé le potentiel d'une thérapie combinant les gènes *TK*, *mIL-2* et *mGM-CSF* dans un modèle murin de cancer d'estomac et elle a découvert que ces trois gènes combinés menaient à une forte destruction des cellules tumorales (Guo SY, 2003).

Un deuxième groupe de chercheurs a créé un herpèsvecteur contenant le gène *hGM-CSF* capable de transduire des lignées cellulaires cancéreuses humaines de la prostate. Subséquemment, les lignées tumorales humaines modifiées étaient capables de produire la cytokine hGM-CSF à des niveaux significatifs pour une période d'au moins trois jours. L'intérêt de ce projet réside dans le fait que plusieurs cancers humains de la prostate résistent à l'hormonothérapie et que ces cancers sont facilement accessibles par les injections requises dans les protocoles de thérapie génique *in vivo*. Par ailleurs, des résultats prometteurs ont été obtenus lors d'études préliminaires faites avec cet herpèsvecteur dans différents modèles de cancers murins soit les mélanomes, les carcinomes rénaux et les sarcomes (Parkinson RJ, 2003).

Finalement, une étude comparative a été réalisée sur l'efficacité de deux vaccins tumoraux exprimant soit mGM-CSF ou hIL-2. Ces vaccins tumoraux concernaient plusieurs types de cancers murins (carcinome rénal, mélanome et sarcome) et permettaient une protection efficace (90%) lorsqu'ils étaient dans un contexte préventif. En effet, l'immunisation avec ces vaccins protégeait les souris contre la formation de tumeur lorsque des cellules cancéreuses non modifiées étaient injectées dans ces souris suite à leur immunisation, et ce, indépendamment de la cytokine qu'exprimaient les vaccins. De plus, ces vaccins retardaient la croissance des masses tumorales lorsqu'ils étaient administrés dans un contexte thérapeutique, quoi

que le vaccin exprimant mGM-CSF semblait être un peu plus efficace que celui exprimant hIL-2 indépendamment du type tumoral testé (Ali SA, 2000).

4. L'IL-2 en immunothérapie protéique, génique et cellulaire du cancer chez l'humain et les modèles murins.

4.1 L'immunothérapie protéique systémique à l'IL-2

L'IL-2 est une interleukine de poids moléculaire de 15.4KDa. Elle est impliquée dans l'immunité cellulaire cytotoxique et était auparavant appelée T Cell Growth Factor (TCGF). L'IL-2 possède plusieurs fonctions dont l'activation et la prolifération des lymphocytes (B et T) et des cellules NK. Elle permet aussi la différenciation de ces cellules en effecteurs de l'immunité cellulaire cytotoxique (CTL, NK et LAK) et la production d'Ac nécessaires à l'ADCC (Antibody Dependant Cell Cytotoxicity)

La production d'IL-2 est restreinte au sous-type I des lymphocytes T auxiliaires (Th1). Les lymphocytes T portent tous des récepteurs de haute affinité pour l'IL-2. Par contre, les cellules NK ne possèdent pas ces récepteurs et nécessitent donc des concentrations plus élevées d'IL-2 pour proliférer et augmenter leur potentiel cytotoxique sous l'influence de cette interleukine.

L'IL-2 est utilisée depuis plusieurs années en immunothérapie du cancer. Le concept de l'immunothérapie du cancer fut introduit en 1893 par William Coley lorsqu'il utilisa des extraits pyogéniques de bactéries pour induire une réponse immunitaire spontanée contre les tumeurs. Malheureusement, les essais de Coley ne produisirent pas les résultats escomptés et furent abandonnés. L'immunothérapie du cancer fut l'objet d'un nouvel enthousiasme avec la découverte des AAT. Depuis ce temps, de nombreuses stratégies sont maintenant explorées en immunothérapie du cancer, allant des stratégies non-spécifiques (telle que l'administration de l'IL-2) à des stratégies beaucoup plus spécifiques (telle que la vaccination avec des AAT) (Kwak H, 2003). De nombreuses études ont été faites dans des modèles murins de cancer et ont suggéré le potentiel thérapeutique de l'IL-2 lorsqu'elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres molécules ou d'autres procédés thérapeutiques (Brockstedt DG, 2002) (Guo SY, 2003) (Koten JW, 2003) (Kimura Y, 2003). Les résultats encourageants obtenus dans ces modèles murins ont mené aux essais cliniques chez l'humain. Des protocoles décrivant l'administration de fortes doses systémiques d'IL-2 synthétique chez des humains atteints de carcinomes rénaux ou de mélanomes ont mené à des régressions partielles et totales des tumeurs (Rosenberg SA, 2001). Par exemple, 26.8% des 56 patients recevant une forte dose d'IL-2 humaine en infusion continue ont connu une réponse (partielle ou totale) dans une étude sur le traitement de carcinomes rénaux avec métastases (Libra M, 2003). Par

contre, l'importante toxicité associée à l'administration systémique de doses élevées d'IL-2 est venue assombrir cette thérapie enthousiasmante.

D'autres protocoles décrivant l'administration systémique d'IL-2 à des doses moyennes ou faibles ont alors été testés chez des patients humains atteints de carcinomes rénaux ou de mélanomes (Mitchell MS, 2003). Dans cet ordre d'idée, une étude a comparé trois stratégies de traitement par administration systémique d'IL-2 chez des patients atteints de carcinomes rénaux avec métastases, soit une stratégie de dose élevée d'IL-2 (720 000 U/kg) administrée par voie intraveineuse, une stratégie de dose faible (72 000 U/kg) aussi administrée par voie intraveineuse ainsi qu'une autre stratégie de la même dose faible (72 000 U/kg) mais administrée par voie sous-cutanée. Les résultats de cette étude démontrent que la dose élevée d'IL-2 permet une réponse favorable [réponses complètes (disparition complète de toutes les métastases visibles pour une période d'au moins un mois) ou partielles (réduction \geq 50% de la somme des produits des deux plus grands axes perpendiculaires de toutes les masses visibles sans aucune apparition de nouvelle masse pendant 1 mois)] chez un plus grand nombre de patients comparativement à la dose faible (intraveineuse ou sous-cutanée). Elle démontre aussi que les toxicités sont moins souvent observées lorsque la dose faible d'IL-2 est administrée comparativement à la dose élevée et que les toxicités sont aussi moins souvent observées lorsque l'administration est faite par voie sous-cutanée comparativement à la voie

intraveineuse. De plus, aucune différence dans les proportions de réponse n'est observée entre l'administration de la faible dose par voie intraveineuse comparativement à l'administration de la même dose par voie sous-cutanée (Yang JC, 2003).

Les taux de régression des cancers, déjà bas lorsque l'IL-2 était administrée à des doses élevées, sont devenus encore plus bas avec les dosages plus faibles. Cette baisse d'efficacité s'explique par le fait que la concentration d'IL-2 obtenue dans l'environnement des tumeurs n'est pas suffisamment élevée lorsque la cytokine est administrée par la voie systémique. En effet, puisque l'IL-2 est une cytokine et que ces molécules ont une action paracrine, elle doit se retrouver en concentration élevée dans l'environnement des cellules tumorales pour activer les cellules du système immunitaire en périphérie des tumeurs et les amener à détruire la masse tumorale (Stagg J, 2004. Communication personnelle).

Puisque l'administration d'IL-2 à de faibles concentrations menait à des taux de réponse insatisfaisants et que l'administration d'IL-2 à des doses élevées mène à une trop grande toxicité systémique, des chercheurs ont soumis l'hypothèse que la synergie souvent rencontrée lors de la combinaison de plus d'une molécule (deux interleukines, une interleukine avec un autre agent chimique, etc.) ou de plusieurs procédés (chimiothérapie combinée à la radiothérapie, chimiothérapie combinée à la chirurgie, etc.) permettrait d'utiliser l'IL-2 à des doses plus faibles tout en ayant une efficacité

souhaitable et une toxicité négligeable. Dans cet ordre d'idée, un groupe de chercheurs a testé la combinaison de la radiothérapie et de l'immunothérapie. Dans un modèle murin de métastases pulmonaires de mélanomes, ils ont soumis les souris à une faible et unique dose d'irradiation (0.75Gy) puis à des traitements quotidiens d'IL-2 (30 000CU x 2) pendant 5 jours consécutifs. En analysant la proportion de métastases retrouvées dans les poumons après le traitement, ils ont comparé la thérapie combinée (radiothérapie avec IL-2) aux témoins requis (aucun traitement, radiothérapie seule ou IL-2 seule) et ont conclu qu'il existait une synergie lorsque la radiothérapie et l'IL-2 étaient combinées pour le traitement des métastases pulmonaires de mélanomes (Safwat A, 2003).

Par ailleurs, un autre groupe de chercheurs a testé la combinaison de deux types d'immunothérapies, soit l'administration d'IL-2 combinée à l'administration de lymphocytes autologues stimulés *in vitro*. Ces chercheurs ont soumis des patients humains atteints de carcinomes rénaux avec métastases, ayant subi une néphrectomie au moins 30 jours avant l'étude, à deux cycles de traitement. Chacun des cycles consistaient à administrer par voie intraveineuse 21.8×10^9 de lymphocytes activés au jour 1 du protocole ainsi qu'à administrer quotidiennement par voie sous-cutanée de 10×10^6 unités d'IL-2 aux jours 1 à 10 inclusivement. Par la suite, un repos de 18 jours était observé avant de refaire ce même traitement une seconde fois. Les résultats de cette étude montraient des signes de toxicité comparables à

ceux observés lors de l'administration de l'IL-2 seule. De plus, aucun patient de l'étude n'a connu une régression partielle ou totale de toutes leurs métastases après les deux cycles de traitement planifiés. Les auteurs émettent cependant l'hypothèse que les cancers développant des métastases au tropisme osseux, tels que les cancers de prostate ou les myélomes, pourraient bénéficier de cette stratégie de traitement puisque 2 patients sur 4 présentant de multiples métastases dont des métastases osseuses au niveau du crâne et du bassin ont connu une régression complète de leurs métastases osseuses (Thompson JA, 2003).

Aussi, un groupe de chercheurs a constaté que l'administration systémique de l'IL-2rh et de l'IFN α_{2a} pour le traitement de cancers mammaires avancés était inefficace. De plus, cette stratégie de traitement était toxique et amenait plusieurs signes cliniques sévères tels que de la fatigue et de la lymphopénie. Le temps moyen de survie des patientes traitées avec ces deux cytokines fût de 8.9 mois et toutes sont décédées suite au traitement (Kimmick G, 2004).

Les thérapies combinées sont de plus en plus à l'étude. Plusieurs chercheurs s'intéressent aujourd'hui aux effets bénéfiques qui pourraient être rencontrés en combinant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et/ou la thérapie génique, combinaisons ralliant nos

connaissances actuelles concernant les modalités thérapeutiques du cancer aux nouvelles découvertes faites dans le domaine de la génie génétique.

4.2 L'immunothérapie locale à l'IL-2 (protéique, génique et cellulaire)

Depuis quelques années, beaucoup d'efforts sont mis dans le développement d'une stratégie qui permettrait d'obtenir une concentration élevée d'IL-2 au niveau des tumeurs tout en minimalisant sa concentration systémique, et par le fait même, ses effets toxiques. Plusieurs modèles thérapeutiques localisant l'IL-2 dans les masses tumorales ont été développés et testés chez des modèles murins de cancer (Brockstedt DG, 2002) (Guo SY, 2003) (Koten JW, 2003) (Kimura Y, 2003). Parmi ces modèles se retrouvent des thérapies *in vivo* et *ex vivo*.

4.2.1 Immunothérapie protéique locale du cancer à l'IL-2 (*in vivo*)

Une étude démontre bien que la voie choisie pour administrer l'IL-2 est un facteur important en thérapie du cancer. De plus, cette étude démontre que les réponses observées sont proportionnelles à la dose administrée dans les petites masses tumorales. Des chercheurs ont testé, dans un modèle murin de mésothéliome (injection sous-cutanée de 5×10^5 ou 1×10^6 cellules dans le flanc gauche des souris) l'administration locale intra-tumorale de différentes doses d'IL-2rh (400U, 4000U ou 40 000U). L'IL-2rh était

administrée 3 fois par semaine jusqu'à ce que les tumeurs aient disparu ou aient atteint un volume maximal de 100mm². Les chercheurs ont constaté que le traitement systémique (IL-2rh administré par la voie intrapéritonéale) des mésothéliomes ne conférait aucun avantage (au niveau de l'inhibition de la croissance tumorale et de la survie des souris) comparativement aux souris qui n'étaient pas traitées (groupes témoins). Par contre, ils ont constaté que le taux de survie des souris augmentait et que la croissance des tumeurs était inhibée lorsque l'IL-2rh était administrée localement (injections intra-tumorales), et ce, à proportionnellement à la dose administrée. De plus, les chercheurs ont observé que cette réponse « dose dépendante » n'était visible que lorsque le traitement à l'IL-2rh était initié dans les petits mésothéliomes. Si les mésothéliomes avaient une taille importante au début du traitement, l'injection intra-tumorale d'IL-2rh n'avait aucun effet bénéfique comparativement aux groupes témoins. Les petits mésothéliomes répondant à l'IL-2rh présentaient de la nécrose, une infiltration de lymphocytes T CD8+ et une destruction des vaisseaux intra-tumoraux ainsi que de ceux péri-tumoraux (Jackaman C, 2003).

Le premier type de traitement local consiste donc à administrer la protéine IL-2 recombinante dans l'environnement des masses tumorales. Des études démontrent l'efficacité de l'IL-2 lorsqu'elle est administrée localement sans être liée à un support physique quelconque. Par exemple, un modèle murin de sarcome cervical induit par HPV (papilloma virus

humain) démontre le bénéfice de l'administration locale de l'IL-2rh. Des fibroblastes murins transfectés avec le génome de HPV-16 ont été injectés dans le flanc droit de souris, à raison de 1×10^6 cellules par injection, puis ces souris ont été traitées par administration d'IL-2rh (10 000U par traitement) par la voie sous-cutanée au niveau du sarcome ou par la voie intrapéritonéale. L'injection locale (sous-cutanée) de l'IL-2rh a permis un retard de la croissance du sarcome (seulement 30% des souris présentaient une tumeur 35 jours après l'inoculation des fibroblastes tumoraux) comparativement à l'administration intrapéritonéale ou à l'administration sous-cutanée dans le flanc opposé à celui portant le sarcome (par contraste, 100% des souris présentaient une tumeur 35 jours après l'inoculation des fibroblastes tumoraux dans ces deux dernières stratégies de traitement) (Casana PH, 2002).

L'IL-2 peut être injectée seule ou sous la forme de complexes réalisés avec des matériaux augmentant la demi-vie de la cytokine qui est d'environ 13 minutes dans des conditions normales (Chada S, 2003). En effet, une équipe de chercheurs a testé l'action de l'IL-2 insérée dans des microsphères biodégradables de dextran (MS) lorsque ces dernières étaient administrées sous la peau des rats. Cette étude comparative a démontrée que l'administration sous-cutanée des MS vides menait à une accumulation locale et précoce de PMN (polymorphonucléaires) suivie par une accumulation de macrophages et par la formation d'une capsule fibreuse autour du dépôt de MS, que l'administration sous-cutanée de l'IL-2 libre menait au « leak syndrome » tandis que l'administration des MS contenant l'IL-2 menait à une

nécrose locale massive. Cette nécrose locale induite par les MS contenant l'IL-2 devient donc une voie intéressante à explorer afin d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs puisqu'elle permet qu'une quantité plus importante d'Ag tumoraux soit relâchée par les cellules cancéreuses nécrosées et que ces Ag soient captés par les CPA. Les CPA présentent ensuite les Ag aux lymphocytes Th1, lymphocytes ayant un rôle central dans l'immunité cellulaire cytotoxique. De plus, contrairement à l'administration d'IL-2 sous la forme libre requérant généralement une injection quotidienne pendant environ 5 jours, l'insertion de l'IL-2 à l'intérieur de MS permet une relâche graduelle de 90% de l'IL-2 qu'elles contiennent sur une période de deux jours. Cette stratégie de traitement permet donc de diminuer la fréquence d'administration de la molécule thérapeutique (Koten JW, 2003).

Les demi-vies des cytokines sont très courtes. Lorsque ces protéines sont administrées aux patients, elles sont présentes très peu de temps au niveau des sites d'injection. Une manière de contrer ce désavantage consiste à faire produire la protéine thérapeutique par les cellules des patients. Les thérapies exposées dans les sections « immunothérapie génique à l'IL-2 » et « immunothérapie cellulaire locale à l'IL-2 » représentent des cas où les cellules du patient produisent l'IL-2. Par contre, la persistance de l'IL-2 dans ces patients est possible à cause d'une expression constante du gène de l'IL-2 et non grâce à une augmentation de la demi-vie d'IL-2.

4.2.2 Immunothérapie génique locale du cancer à l'IL-2 (*in vivo*)

Le deuxième type de traitement consiste à transférer chez le patient le gène de l'IL-2 directement dans les cellules tumorales ou dans les cellules intimement liées aux cellules tumorales (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules du système immunitaire, etc.) Pour ce faire, le gène peut soit être injecté sous forme d'ADN nu ou à l'intérieur de vecteurs. Plusieurs études cherchent à démontrer le potentiel de l'IL-2 délivrée par des vecteurs viraux en immunothérapie génique du cancer. En effet, l'IL-2 possède un rôle important dans l'immunité cellulaire cytotoxique et les vecteurs viraux sont capables de transduire des cellules *in vivo* avec une efficacité considérée souvent plus grande que l'efficacité obtenue lors de l'utilisation des autres moyens de transduction (Evans ME, 2002) (Galipeau J, 1999) (Nadeau I, 2003).

Une étude démontre l'utilisation d'adénovecteurs (1^{ère} génération, sérotype 5) codant pour l'IL-2 humaine dans le traitement de plasmocytomes cutanés. Ayant montré par des études préliminaires le potentiel thérapeutique de cette stratégie dans des modèles murins de plasmocytome, les chercheurs ont injecté ces adénovecteurs dans des plasmocytomes cutanés d'une femme de 46 ans atteinte de myélome multiple résistant à la chimiothérapie. Les plasmocytomes chez cette femme résultaient de métastases du myélome multiple et leur nature fut confirmée par biopsie. Des biopsies effectuées après les injections ont démontré que le gène

synthétique de l'IL-2 humaine était présent dans les plasmocytomes cutanés et que ce gène était activement transcrit (présence d'ARNm de l'IL-2 humaine dans les plasmocytes). Ils ont pu différencier l'IL-2 humaine endogène à l'IL-2 humaine synthétique grâce à un site de restriction absent dans l'IL-2 synthétique mais présente dans l'IL-2 endogène. Par contre, aucune régression des plasmocytomes injectés ni aucune infiltration des ces métastases par des lymphocytes T ne furent observées. Bien qu'un seul patient ne fût étudié, les résultats encourageants vus dans le modèle murin ne semblent pas se transposer à l'humain (Stewart AK, 1998). Une autre d'étude réalisée avec des adénovecteurs de sérotype 5 codant pour l'IL-2 injectés à l'intérieur de cancers mammaires montrait une régression totale des masses injectées et des métastases ainsi que l'induction d'une immunité systémique mémoire dans les modèles murins. Par contre, cette même thérapie appliquée à des cancers mammaires humains n'a montré qu'une infiltration des masses injectées par des lymphocytes T. Quelques rares patientes ont connu une régression des masses injectées démontrant une fois de plus la discordance observée entre les résultats obtenus dans les modèles murins et ceux obtenus dans les humains (Stewart AK, 1999).

Le gène de l'*IL-2* est souvent utilisé en combinaison avec un autre gène lors d'immunothérapie génique du cancer. Plusieurs groupes de chercheurs testent la combinaison de l'IL-2 avec la TK afin d'augmenter l'efficacité des thérapies développées. En effet, la TK provoque la nécrose

des cellules tumorales l'exprimant et cette nécrose augmente la disponibilité des Ag tumoraux dans l'environnement de la tumeur où se retrouvent les lymphocytes activés par l'IL-2.

Parfois, un autre gène de cytokine (souvent *GM-CSF*) est aussi utilisé avec ceux de l'IL-2 et de la *TK* de façon à élargir le spectre des cellules immunitaires activées dans l'environnement des tumeurs traitées. Par exemple, un groupe de chercheurs a testé l'efficacité des gènes *TK*, *hIL-2* et *mGM-CSF* à mener à la destruction de carcinomes mammaires murins non-immunogéniques. Les tumeurs ont été créées en implantant 2.5×10^5 cellules de carcinome dans le flanc droit des souris et ont été injectées 8 jours plus tard avec 1×10^{10} adénovecteurs codant pour HSV-TK et/ou 5×10^{10} adénovecteurs codant pour hIL-2 et mGM-CSF. L'administration intrapéritonéale de GCV commençait 18 heures après l'injection des adénovecteurs pendant 10 jours consécutifs. Les auteurs ont démontré que la thérapie combinée (*TK* avec *hIL-2* et *mGM-CSF*) empêchait la croissance des tumeurs de façon significative et prolongeait la survie des souris (20 à 30% des souris étaient encore vivantes 75 jours après l'administration des vecteurs) comparativement aux témoins (aucune souris vivante 75 jours après l'administration des vecteurs). De plus, l'exérèse de la masse tumorale 2 jours après la dernière administration de GCV augmentait considérablement le nombre de souris vivantes 75 jours après l'administration des vecteurs (70% comparativement à 20-30% lorsque

l'exérèse n'était pas comprise dans le traitement). Par ailleurs, les auteurs ont constaté une diminution de la grosseur et du nombre de métastases pulmonaires lorsque les trois gènes étaient utilisés en traitement simultané et que ces gènes permettaient l'induction d'une immunité antitumorale spécifique et systémique protégeant la majorité des souris contre toute exposition ultérieure à la même lignée tumorale (Brockstedt DG, 2002).

Dans une autre étude, des chercheurs ont testé le potentiel antitumoral d'une thérapie combinant des rétrovecteurs codant pour la TK et des liposomes codant pour *mIL-2* ou *mGM-CSF* dans un modèle murin de tumeur gastrique. Les cellules tumorales, provenant d'un carcinome murin de l'estomac proximal, ont été implantées à raison de 5×10^5 cellules dans le flanc des souris. Le traitement a été institué 5 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Les rétrovecteurs codant pour la TK ont été injectés dans les masses tumorales tandis que les liposomes codant pour *mIL-2* ou *mGM-CSF* ont été injectés dans les tissus environnant les tumeurs. L'administration du GCV par voie intrapéritonéale débutait trois jours après la dernière administration de rétrovecteurs et était maintenue pendant 3 semaines. Les résultats de cette étude démontrent que la thérapie génique combinant les trois gènes (*TK*, *mIL-2* et *mGM-CSF*) possède le plus fort potentiel antitumoral lors de traitement de carcinomes gastriques murins comparativement au gène suicide utilisé seul (*TK*) ou en combinaison avec l'un ou l'autre gène des deux cytokines testées (*TK* avec *mIL-2* ou *TK* avec *mGM-CSF*) (Guo SY, 2003).

Une troisième étude testait le potentiel antitumoral de rétrovecteurs codant pour HSV-TK et hIL-2 dans un modèle murin de carcinome différencié de la thyroïde et un modèle murin de carcinome anaplasique de la thyroïde, soit deux carcinomes possédant un caractère très malin et associés à un faible taux de survie chez l'humain. Les modèles ont été créés en implantant 8×10^6 cellules tumorales de carcinome humain de la thyroïde (différencié ou anaplasique) transduites *in vitro* avec les rétrovecteurs dans chacun des 2 flancs de souris nues. La thérapie génique combinée utilisant des rétrovecteurs codant pour TK et hIL-2 et la GCV en administration intrapéritonéale permettait une éradication complète des carcinomes thyroïdiens anaplasiques et une réduction plus grande que 80% de la grosseur des carcinomes thyroïdiens différenciés. La thérapie combinant les gènes *hIL-2* et *HSV-TK* s'est montrée beaucoup plus efficace que celle n'utilisant que le gène *hIL-2* dans la thérapie de carcinomes thyroïdiens anaplasiques ou différenciés (Barzon L, 2003).

Une autre étude démontre bien la synergie rencontrée lorsque l'immunothérapie est combinée à la thérapie suicide dans le traitement du glioblastome multiforme humain. Cette tumeur possède un pronostic très sombre puisqu'elle engendre la mort de 80% des patients affectés 6 à 12 mois après un traitement initial par chirurgie, chimiothérapie et/ou radiothérapie. Une équipe de chercheurs a testé l'administration intratumorale de cellules murines productrices de rétrovecteurs (CmPRV) codant

pour TK et hIL-2 chez 4 patients humains atteints de glioblastome multiforme. Cette tumeur se prête bien à la thérapie génique *in vivo* par des rétrovecteurs puisqu'elle se retrouve entourée d'un tissu essentiellement non mitotique (les cellules nerveuses normales ne se divisent pas ou très peu) et que les gènes transportés par les rétrovecteurs ne peuvent s'intégrer que dans les chromosomes des cellules en division (ici représentées par les cellules tumorales des glioblastomes et les cellules constituant les vaisseaux sanguins présents à l'intérieur de ces tumeurs). Des doses de 1.5×10^8 à 3×10^8 CmPRV ont été injectées dans les tumeurs. Aucun effet secondaire n'a été noté chez les 4 patients ni aucune évidence de rétrovecteurs compétents dans la réplication (RCR). Par contre, malgré le fait que la thérapie instituée était locale, les cellules mononucléaires périphériques d'un patient ont été transduites. Les auteurs ne semblent cependant pas contrariés par ce dernier évènement. Les résultats obtenus furent une régression substantielle (50% du volume initial) et soutenue du glioblastome injecté chez un patient ainsi que des zones nécrotiques présentes autour du site d'implantation des CmPRV dans les glioblastomes de deux autres patients. Les glioblastomes injectés avec les CmPRV démontraient tous une importante infiltration cellulaire principalement constituée de cellules mononucléaires (lymphocytes CD8+ et CD4+, macrophages et cellules NK) ainsi que de neutrophiles. Cette étude, lorsque comparée à une étude similaire où les CmPRV produisaient des rétrovecteurs ne codant que pour TK, montre bien l'action synergique des gènes *TK* et *IL-2* lorsqu'ils sont employés simultanément. En effet,

l'étude où seul le gène *TK* était utilisé ne montre qu'une réponse dans les glioblastomes de petite taille (1.5ml) et cela, sans aucune infiltration de cellules immunitaires dans les tumeurs traitées (Palù G, 1999).

4.2.3 Immunothérapie cellulaire locale du cancer à l'IL-2 (*ex vivo*)

Le dernier type de traitement consiste à transférer le gène de l'*IL-2* à l'intérieur des cellules du patient en laboratoire puis à réadministrer ces cellules modifiées pour exprimer l'*IL-2* à l'intérieur des patients cancéreux. Par cette stratégie, nommée immunothérapie cellulaire du cancer, il devient possible de contrôler la quantité de protéine qui sera produite dans le patient (en mesurant la production d'*IL-2* des cellules modifiées en laboratoire avant de les administrer au patient) et de vérifier l'efficacité de transduction des véhicules utilisés (liposomes, vecteurs viraux, etc.) par des analyses en laboratoire des cellules modifiées. De plus, il est possible d'introduire les cellules modifiées dans diverses unités immunoisolantes et de les administrer sous forme d'implant aux patients au lieu de les administrer en injection libre. Cette dernière méthode est particulièrement souhaitable lorsqu'un retrait des cellules modifiées est prévu un temps défini après leur administration, ou tout simplement lorsque des effets toxiques secondaires associés à la thérapie sont anticipés.

Une première étude montre que la thérapie cellulaire combinant des cellules de carcinome spinocellulaire (SCC) oral humain modifiées pour exprimer hIL-2 et d'autres modifiées pour exprimer mL-12 est efficace et sécuritaire pour le traitement des carcinomes spinocellulaires chez la souris. Les auteurs ont implanté 5×10^6 cellules de SCC oral humain dans le flanc droit de souris «nues» (déficientes en lymphocytes T) puis ils ont traité ces souris en injectant des cellules de SCC oral humain irradiées (2000 rad) et modifiées pour exprimer hIL-2 et/ou mL-12 autour des tumeurs pré-établies. Les résultats montrent que la thérapie utilisant seulement les cellules exprimant hIL-2 ou celle utilisant seulement les cellules exprimant mL-12 ne sont pas efficaces tandis que la thérapie utilisant les 2 types de cellules simultanément (celles exprimant hIL-2 et celles exprimant mL-12) interfère avec la croissance des SCC oraux humains dans les souris «nues». De plus, puisque les cellules modifiées et irradiées ne survivent que 3 jours en culture, les auteurs considèrent cette thérapie sécuritaire (Kimura Y, 2003). Un détail important de cette thérapie cellulaire est que les souris de type «nues» sont déficientes au niveau de l'immunité acquise (lymphocytes T) et, par conséquent, les effets observés ne doivent être attribués qu'à l'immunité innée (cellules NK, macrophages, neutrophiles, etc.).

Par ailleurs, une deuxième étude démontre le potentiel préventif et thérapeutique d'un vaccin constitué de cellules tumorales modifiées pour exprimer mGM-CSF ou hIL-2. En effet, une équipe de chercheurs a modifié

des cellules murines de carcinomes rénaux, de mélanomes ainsi que de sarcomes par l'entremise d'un herpèsvecteur codant pour mGM-CSF ou hIL-2. Par la suite, ils ont testé les potentiels préventif et thérapeutique de ces vaccins tumoraux. Le potentiel préventif, ayant pour but de prévenir les récurrences, fut testé en immunisant des souris par la voie sous-cutanée au niveau du flanc droit avec des cellules tumorales modifiées et irradiées (15 000 rad). Deux immunisations ont été réalisées en laissant deux semaines d'intervalle entre chacune d'elles. 5×10^4 cellules tumorales naïves furent implantées dans le flanc opposé des souris une semaine après la dernière immunisation et la croissance des tumeurs a été suivie. Les résultats démontrent que l'immunisation réalisée avec les cellules tumorales modifiées protégeait davantage les souris qu'une immunisation témoin effectuée avec les cellules tumorales non modifiées, autant en ce qui concerne le carcinome rénal que le sarcome et cela, peu importe la cytokine exprimée par les cellules modifiées (hIL-2 ou mGM-CSF). Par ailleurs, le potentiel thérapeutique de ces vaccins tumoraux fut testé en implantant 5×10^4 cellules tumorales non modifiées dans le flanc droit des souris puis en administrant 1×10^6 cellules modifiées, soit le même jour ou soit 3 jours plus tard, aux souris. Chaque souris reçut trois traitements de cellules modifiées, chacun espacé de 3 jours. Les résultats démontrent que le traitement réalisé avec les cellules tumorales modifiées et administrées en un site adjacent à la tumeur est efficace en retardant l'établissement et la croissance des tumeurs. En effet, une forte proportion des souris traitées de cette façon restait

exempte de tumeur 9 semaines après l'implantation des cellules tumorales. En résumé, la modification de cellules tumorales murines de carcinomes rénaux, de mélanomes et de sarcomes avec le gène de l'IL-2 ou de GM-CSF leur confère de bons potentiels préventif et thérapeutique en thérapie cellulaire locale de cancers murins (Ali SA, 2000).

La troisième étude exposée dans cette section démontre que l'immobilisation de l'IL-2 à la surface des cellules modifiées à l'aide de récepteurs transmembranaires reconnaissant l'IL-2 permet d'obtenir des concentrations locales plus élevées d'IL-2 que les concentrations obtenues lorsque cette IL-2 est secrétée dans l'environnement des cellules modifiées. De plus, l'immobilisation de l'IL-2 à la surface des cellules modifiées augmente la demi-vie de cette cytokine. Dans cette étude, des chercheurs ont modifié des cellules murines de mélanomes afin qu'elles expriment l'IL-2 liée à un récepteur nommé GPI (glycoinositol phospholipid). GPI est un récepteur liant plusieurs protéines à la surface des cellules (telles des enzymes, des protéines de surface, des Ag de surface, des molécules d'adhésion, etc.) et qui possède une structure lipidique universelle permettant au récepteur de s'ancrer dans plusieurs membranes cellulaires peu importe le type de protéine qu'il lie. Les chercheurs ont injecté des cellules de mélanome murin modifiées pour exprimer l'IL-2 liée à GPI dans la circulation sanguine de souris puis ils ont analysé l'effet de cette thérapie en suivant la formation de mélanomes dans les poumons des souris. Cette thérapie fut

comparée à une thérapie où le même type de cellules (mélanome murin) a été modifié pour sécréter l'IL-2 et où ces cellules ont aussi été administrées dans la circulation sanguine de souris. Les résultats ont montré que la thérapie utilisant l'IL-2 liée à GPI menait à une plus grande infiltration de lymphocytes T dans les mélanomes pulmonaires et qu'elle empêchait la croissance des tumeurs alors que la thérapie où les mélanomes secrètent l'IL-2 n'a induit aucun effet antitumoral. De plus, ils ont cultivé des cellules de mélanomes non modifiées avec des cellules de mélanomes modifiées pour exprimer IL-2 liée à GPI, sans permettre un contact entre ces deux types cellulaires mais en permettant au surnageant de circuler librement d'un type cellulaire à l'autre, et ils ont démontré que la molécule constituée de l'IL-2 liée à GPI pouvait se détacher des cellules modifiées pour aller se fixer sur la membrane des cellules adjacentes ne possédant pas les gènes requis pour leur expression (Ji J, 2002).

Ce mécanisme, où des cellules qui expriment des gènes thérapeutiques peuvent produire les molécules thérapeutiques et où ces molécules peuvent par la suite se retrouver sous la forme libre ou sous la forme fixe (tant à la surface des cellules modifiées qu'à la surface des cellules adjacentes ne possédant pas leurs gènes) rappelle le mécanisme nommé « bystander effect » rencontré lors de thérapie suicide avec le gène *HSV-TK*. Ce mécanisme permet donc de maximiser la thérapie du cancer en permettant au patient d'augmenter lui-même le potentiel antitumoral de la

thérapie simplement en produisant constamment une molécule thérapeutique pouvant se propager de cellule en cellule, en alternant entre la forme libre et la forme attachée aux membranes cellulaires (Ji J, 2002).

Par contre, même si ces nouvelles modalités thérapeutiques réussissent à localiser l'IL-2 dans l'environnement de la tumeur et à empêcher toute toxicité systémique, elles ne réussissent pas à éradiquer efficacement les cancers chez les humains (Tartour E, 2000) (Stewart AK, 1999) (Stewart AK, 1998). Deux hypothèses sont alors soulevées pour expliquer ces échecs : premièrement, les divergences rencontrées entre les modèles murins et les humains et deuxièmement, la double action que possède l'IL-2.

Les divergences rencontrées entre les souris et les humains sont explorées dans le chapitre suivant.

La double action de l'IL-2 consiste en sa capacité à activer les lymphocytes ou à induire leur apoptose proportionnellement à sa concentration dans l'environnement des cellules du système immunitaire. En effet, une étude a démontré que l'induction d'effecteurs cytolytiques (CTL) était interrompue et que la protection des souris vaccinées contre une exposition subséquente aux cellules tumorales était empêchée lorsque la concentration d'IL-2 dépassait 5000 U par 100 000 cellules (Schmidt W, 1995).

Par ailleurs, une autre étude suggère ce double rôle de l'interleukine 2 en montrant la relation entre la dose d'IL-2 humaine administrée et la densité de lymphocytes retrouvés au site d'administration. En effet, des chercheurs ont examiné l'administration péri-tumorale d'un composé nommé Multikine®, le surnageant de cellules mononucléaires périphériques cultivées avec un mitogène. Les principales cytokines humaines retrouvées dans ce composé sont l'IL-2, l'IL-1 α , le GM-CSF, l'IFN α et le TNF α . Multikine® était injecté autour de carcinomes spinocellulaires oraux humains à une des trois doses suivantes, soit : 2400, 4800 ou 8000 IU (eq IL-2). Les chercheurs ont constaté que la plus faible dose seulement (2400 IU) induisait une accumulation importante de lymphocytes dans l'épithélium tumoral des carcinomes ainsi qu'une plus grande proportion de lymphocytes activés (exprimant CD25) dans l'épithélium et le stroma tumoraux. Par contre, aucune de deux autres doses ne procuraient ces effets. Ils concluent donc en mentionnant que l'IL-2 humaine utilisée à de fortes doses pourrait avoir un rôle de régulation négative (l'IL-2 induirait l'apoptose des lymphocytes au lieu d'induire leur prolifération) puisque aucune différence n'est vue quant à la quantité de lymphocytes (naïfs ou activés) présents dans les carcinomes spinocellulaires oraux traités avec de fortes doses d'IL-2 et ceux non traités. De plus, l'administration péri-tumorale de Multikine® induisait l'entrée d'une forte proportion de cellules cancéreuses dans le cycle cellulaire, fait très intéressant si l'on considère l'administration de Multikine® dans une stratégie combinant l'immunothérapie à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. En

effet, les cellules au stade Go du cycle cellulaire sont souvent résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie tandis que les cellules entrées dans le cycle cellulaire deviennent sensibles à ces deux modalités thérapeutiques (Timar J, 2003).

Ce dernier point nous fait comprendre l'importance de bien connaître les caractéristiques des molécules choisies lors du traitement du cancer ainsi que l'importance de pouvoir contrôler les doses de ces molécules administrées lors des thérapies. Quoique la localisation de l'IL-2 dans l'environnement des tumeurs soit un prérequis difficilement contestable, la nécessité d'obtenir des concentrations très élevées à l'intérieur des tumeurs reste à être vérifiée.

5. Les modèles animaux pour l'étude des cancers

Un homme de 18 ans ayant une déficience partielle en ornithine transcarbamylase (OTC) est mort 98 heures après l'initiation d'une étude pilote servant à vérifier la sécurité de l'administration systémique de doses croissantes d'adénovecteurs codant pour le gène d'OTC humain. Cet homme est mort d'un syndrome inflammatoire systémique accompagné de CIVD (coagulation intravasculaire disséminée) et d'une défaillance de plusieurs de ses organes en réaction à l'administration systémique via l'artère hépatique droite d'une dose (6×10^{11} particules/kg) d'adénovecteurs de sérotype 5

(délétion des régions E1 et E4). Or, des études précédentes réalisées dans des souris et des primates non humains avaient démontré la sécurité du protocole testé chez cet homme (type de vecteur, dose administrée et voie utilisée). Cette mort imprévue établit donc les limites des études faites dans les modèles animaux en regard de la prédiction de la réponse qui sera observée chez l'humain, de la prédiction de la toxicité de la thérapie à être instituée chez l'humain et de la prédiction de la réponse immunitaire qui sera montée contre les vecteurs testés chez l'humain (Raper SE, 2003). Cette tragique conséquence, combinée à d'autres inconvénients inattendus, nous montre l'importance de bien choisir les modèles animaux chez qui on désire tester les stratégies thérapeutiques pour les cancers.

Depuis quelques années, des articles remettant en question l'utilisation des modèles murins surgissent dans la littérature scientifique (Vail DM, 2000) (Knapp DW, 1997). Ces auteurs soulignent de multiples aspects suggérant que les animaux de compagnie (chien et chat) seraient de meilleurs modèles pour comprendre la biologie des cancers, pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et pour vérifier l'efficacité et la sécurité de ces traitements avant de les utiliser en études cliniques chez l'humain.

Plusieurs différences existent entre les rongeurs utilisés depuis très longtemps dans les protocoles de recherche et les humains chez qui on désire appliquer les thérapies développées. Ces différences sont importantes

et influencent sûrement les réponses observées chez les humains suite à l'application des traitements développés contre le cancer. Parmi ces différences, nous retrouvons : la masse corporelle (les humains sont 2000 fois plus lourds que les rongeurs), la longévité (les humains vivent 26 fois plus longtemps que les rongeurs) et l'âge auquel le cancer est présent dans l'animal (les cancers apparaissent à un âge tardif chez l'humain mais sont institués dans des modèles murins relativement jeunes). En effet, plus l'animal est vieux, moins l'immunité cellulaire innée et acquise sont performantes. La quantité moindre de cellules immunitaires produites par l'animal, leur capacité atténuée de migration aux sites des tumeurs et leur efficacité moins grande à reconnaître et détruire les cellules tumorales sont les trois facteurs qui peuvent contribuer à la diminution de la performance du système immunitaire dans un animal âgé (Cui Z, 2004). En effet, une étude a démontré que les cellules NK et LAK de souris âgées (immunité innée) possédaient une translocation nucléaire moins efficace des facteurs de transcription STAT 5A et STAT 5B ainsi qu'une quantité moindre d'ARNm codant pour diverses chémokines comparativement aux cellules NK et LAK des souris plus jeunes. Aussi, la capacité cytotoxique des cellules NK/LAK fraîchement isolées des souris âgées est moins grande que celle des cellules NK/LAK fraîchement isolées des souris plus jeunes (Albright JW, 2004). Si ces variations sont également vraies chez l'humain, alors les jeunes modèles murins fréquemment utilisés en recherche ne constituent pas de bons

modèles pour développer des thérapies antitumorales efficaces chez les patients humains cancéreux relativement âgés.

Parmi les autres différences retrouvées entre ces deux espèces, il y a la diversité génétique de l'humain, l'environnement dans lequel les animaux de laboratoire sont gardés, la diversité du « style de vie » des deux espèces (les rongeurs sont tous en cage tandis que le style de vie des humains diffère beaucoup si l'on compare, par exemple, les sédentaires aux gens plus actifs, les fumeurs aux non fumeurs, etc.) et la nature des tumeurs étudiées chez les rongeurs. Voici un tableau résumant les principales différences énumérées précédemment.

	Souris	Humains	Chiens
Masse corporelle	25g	50kg à 160kg	2kg à 60kg
Longévité	2 à 3 ans	78 à 82 ans	15 à 18 ans
Âge où il y a incidence élevée de cancer	4 à 6 semaines	50 ans et plus	10 ans et plus
Diversité génétique	Homogène (inbreeding)	Hétérogène (outbreeding)	Hétérogène (outbreeding)
Environnement	Homogène et artificiel (cage)	Variable et naturel	Variable (identique au propriétaire)
Style de vie	Homogène (cage)	Variable	Variable (identique au propriétaire)
Nature des tumeurs	Chimique ou implant	Spontanée	Spontanée

Tableau III. Comparaison entre les souris, les chiens et les humains.

À toutes ces différences s'ajoutent d'autres considérations, la première étant que les modèles de tumeur étudiés chez les rongeurs consistent souvent en des tumeurs dites non orthotopiques, c'est-à-dire en des tumeurs implantées dans un site autre que celui où elles se retrouvent habituellement. Par exemple, des modèles murins de carcinome du colon et de carcinome rénal ont été créés en injectant des lignées tumorales dans le derme de l'abdomen des souris (Shi F, 2002). Or, changer la localisation des tumeurs change du même coup plusieurs autres paramètres tels que la vascularisation disponible (apport en oxygène, nutriments et élimination des déchets métaboliques), les populations résidentes d'effecteurs du système immunitaire, la température, le pH, les facteurs de croissance retrouvés dans les tissus environnants, etc.

Une autre considération importante est que les rongeurs sont des mammifères éloignés phylogéniquement de l'humain si on les compare à d'autres mammifères plus grands et possèdent donc des caractéristiques propres à leur espèce modifiant beaucoup leur défense contre le cancer. Entre autre, les rongeurs possèdent une proportion beaucoup plus grande de cellules NK-T que l'humain, cellules de plus en plus reconnues comme des effecteurs importants dans la lutte contre le cancer (Smyth MJ, 2002). De plus, l'IL-21 permet l'expansion des cellules NK humaines à partir des précurseurs hématopoïétiques ainsi que leur maturation en effecteurs lytiques tandis que cette même cytokine inhibe l'expansion des cellules NK murines (Habib TH,

2003). Or, les cellules NK sont reconnues pour participer à l'immunité antitumorale de façon considérable en tuant les cellules tumorales qui n'expriment pas le CMH I à leur surface.

Considérons aussi la pharmacocinétique et le métabolisme des médicaments différents entre les rongeurs et l'humain. En effet, une étude a démontré que le piroxicam (un anti-inflammatoire non stéroïdien) possédait une demi-vie de 9 à 16 heures chez le rat tandis qu'il possédait une demi-vie de 45 heures chez l'humain, soit une demi-vie d'au moins 3 fois plus longue. Par contre, cette même étude a démontré que la demi-vie du piroxicam chez le chien était de 43 heures, donnée intéressante si on se demande quel animal pourrait remplacer les modèles de rongeur dans les études pré-cliniques (Knapp DW, 1997).

Le cancer constitue la cause la plus importante de mortalité chez les chiens âgés de plus de 10 ans et l'incidence du cancer pour 100 000 individus par an (en ajustant l'âge) est estimée à 381 pour les chiens, à 264 pour les chats et à 300 pour les humains aux États-Unis, taux qui sont donc comparables pour ces trois espèces (Vail DM, 2000). La majorité des points discordants soulignés lorsqu'on compare les rongeurs aux humains disparaissent lorsque cette comparaison est faite entre le chien et l'humain (voir tableau III).

Un aspect intéressant du modèle canin est que la masse corporelle plus élevée des chiens permet aux chercheurs de réaliser plusieurs procédures plus facilement telles que la récolte d'échantillons (urine, sérum, LCR et biopsie), les diagnostics et suivis cliniques par imagerie médicale, les interventions chirurgicales et l'administration de médicaments par des voies moins fréquemment utilisées telles que la voie intranasale ou celle rectale (Vail DM, 2000) (Parkinson C, 1993).

Par ailleurs, une étude soutient que les systèmes immunitaires canins et humains se ressemblent plus que les systèmes immunitaires murins et humains. Cette étude démontre en outre que le chien possède un système immunitaire mature à la naissance, qu'il possède des lymphocytes de phénotype $CD8\alpha\beta+$ dans ses épithéliums ainsi que, dans sa peau, des lymphocytes T dont le TCR est constitué des chaînes $\alpha\beta$ comme chez les humains. Par opposition, les rongeurs ne possèdent pas un système immunitaire mature à leur naissance, possèdent des lymphocytes au phénotype $CD8\alpha\alpha+$ dans leurs épithéliums et, dans leur peau, des lymphocytes T dont le TCR est constitué des chaînes $\gamma\delta+$ (Felsburg PJ, 2002).

Par ailleurs, ajoutons que les rétrovirus sont rarement la cause de cancer chez l'humain et chez le chien tandis qu'ils causent énormément de cancers chez les rongeurs. De plus, le génome des rongeurs possède beaucoup de gènes de rétrovirus qui se sont intégrés dans le génome de ces

animaux et qui y ont persisté au cours de l'évolution des rongeurs. L'utilisation de rétrovecteurs déficients dans leur réplication en thérapie génique du cancer chez l'humain et le chien est alors beaucoup moins inquiétante que leur utilisation chez les rongeurs. En effet, des recombinaisons entre les rétrovecteurs et des séquences endogènes de rétrovirus sont beaucoup moins probables chez l'humain et le chien que chez les rongeurs, recombinaisons qui pourraient rendre aux rétrovecteurs leur habileté à se répliquer et à se propager dans l'animal traité avec les rétrovecteurs (Martineau D, 2004. Communication personnelle).

Plusieurs types de cancer apparaissent spontanément chez les chats et/ou les chiens avec une incidence relativement élevée. Parmi les cancers canins et félins les plus fréquents, certains adoptent des comportements biologiques (invasion, métastases) et des réponses à la chimiothérapie et à la radiothérapie similaires aux cancers humains. Ces cancers deviennent donc de bons modèles pour étudier de multiples aspects tels que leur étiologie, leur pathophysiologie ainsi que les modalités thérapeutiques nouvellement développées pour les détruire. Les cancers canins et félins correspondant le mieux biologiquement aux cancers humains sont : les lymphomes non-Hodgkin et les leucémies canines, les ostéosarcomes canins, les hémangiosarcomes canins, les mélanomes canins, les carcinomes mammaires et les sarcomes des tissus mous (Vail DM, 2000). Mentionnons cependant que d'autres types de cancer à l'incidence beaucoup

moins élevée demeurent de bons modèles tels que les carcinomes de la prostate canins ainsi que les carcinomes des cellules transitoires (Knapp DW, 1997).

6. L'IL-2 en immunothérapie protéique, génique et cellulaire du cancer chez les modèles canins.

Comme vu dans le chapitre précédent, le chien est un modèle beaucoup plus approprié pour étudier des nouvelles stratégies de traitement des cancers humains. Les types de tumeurs fréquemment retrouvés chez le chien ainsi que leur nature spontanée sont deux avantages indéniables du modèle animal canin. Dès lors, il nous est possible de supposer que toute nouvelle stratégie développée chez le chien et démontrant une efficacité acceptable serait aussi efficace en thérapie de cancers humains. Conséquemment, des études réalisées avec des modèles canins sont de plus en plus fréquentes dans la littérature scientifique depuis quelques années.

6.1 Immunothérapie protéique locale du cancer à l'IL-2 (*in vivo*)

Une stratégie fréquemment testée dans les modèles canins est l'inhalation de liposomes contenant l'IL-2 (forme protéique) comme molécule thérapeutique dans le traitement de métastases pulmonaires. L'IL-2 ainsi

formulée possède une demi-vie plus longue que l'IL-2 libre. Par ailleurs, la nébulisation de liposomes dans les voies aériennes permet d'obtenir des concentrations soutenues d'IL-2 dans les poumons et d'éviter la toxicité systémique rencontrée lorsque l'IL-2 est administrée par la voie systémique (Khanna C, 1997). De plus, la nature des lipides utilisés pour fabriquer les liposomes ainsi que l'aspect particulaire que prennent ces derniers modifient la biodistribution des liposomes et potentialise leur phagocytose par les CPA résidant dans les poumons des chiens (Skubitz KM, 2000).

Une étude a évalué la nébulisation de liposomes contenant de l'IL-2rh chez sept chiens qui avaient des métastases pulmonaires (d'ostéosarcome, de carcinome mammaire, de mélanome digital ou de fibrosarcome) et chez deux chiens atteints de carcinome pulmonaire primaire. Les liposomes étaient constitués de lipides synthétiques, d'albumine humaine et d'IL-2rh (activité spécifique de 1.4×10^7 U par mg). Deux des quatre chiens de l'étude qui portaient des métastases pulmonaires d'ostéosarcome ont eu une régression complète de leurs métastases. L'un de ces deux chiens reçut deux traitements quotidiens d'une durée de 15 à 20 minutes chacun pour une période de 15 jours suivi de trois traitements quotidiens pour 15 jours additionnels. L'autre chien reçut, quant à lui, 3 traitements quotidiens pour une période de 30 jours. Chaque traitement contenait 1×10^6 U d'IL-2rh dans des liposomes. La toxicité associée au traitement fut minimale (légère toux immédiatement après la nébulisation) et aucune réaction allergique associée au traitement ne fut notée chez les 9 chiens. Par contre, tous les chiens

possédaient des taux élevés d'Ac contre l'IL-2rh et l'albumine humaine après la thérapie. Les auteurs soumettent l'hypothèse que ces Ac pourraient être la cause de la diminution de l'activité cytolytique des effecteurs du système immunitaire retrouvés dans le lavage bronchoalvéolaire à la fin des 30 jours de la thérapie. Les auteurs concluent cette étude en énonçant que la thérapie par nébulisation de liposomes contenant l'IL-2rh chez des chiens portant des métastases pulmonaires d'ostéosarcome est efficace et sécuritaire (Khanna C, 1997). La substitution de l'IL2-rh par l'IL-2 recombinante canine serait certainement une voie à explorer en ce qui concerne la thérapie des cancers canins pour tenter de diminuer la formation d'Ac contre la protéine IL-2.

Suite à ces résultats encourageants chez le chien, des chercheurs se sont intéressés à la sécurité de cette stratégie de traitement chez des patients humains atteints de métastases pulmonaires. Une étude similaire a donc été menée sur neuf patients portant des métastases pulmonaires provenant de sarcomes, de carcinomes rénaux ou de mélanomes. Trois groupes de 3 patients ont été créés, chacun recevant une dose différente de liposomes, soit 1.5×10^6 , 3×10^6 et 6×10^6 U d'IL-2 par traitement et tous recevant 3 traitements quotidiens d'une durée moyenne de 20 minutes sur une période totale de 28 jours. Aucune toxicité ne fut observée dans les trois groupes. Les auteurs ont donc conclu que cette stratégie de traitement était sécuritaire chez les humains. Par contre, l'efficacité antitumorale de cette stratégie de traitement chez l'humain affligé de métastases pulmonaires reste

à être vérifiée de même que la dose idéale de liposomes à administrer ainsi que la durée idéale du traitement à respecter (Skubitz KM, 2000).

6.2 Immunothérapie génique locale du cancer à l'IL-2 (*in vivo*)

Plusieurs études portant sur le transfert du gène de l'IL-2 par les liposomes ou les vecteurs viraux ont été réalisées dans des modèles canins de tumeurs. Ces résultats nous permettent de prédire plus précisément l'efficacité de transduction qui serait obtenue lors de l'utilisation de ces véhicules pour transférer des gènes thérapeutiques dans des patients cancéreux humains.

Une première étude testait l'injection intra-tumorale de liposomes codant pour l'IL-2 canine (*cIL-2*) et le superantigène « entérotoxine A de *Staphylococcus aureus* » (*SEA*) chez 16 chiens atteints de sarcomes des tissus mous. Les chiens inclus dans l'étude portaient des sarcomes de taille initiale plus petite que 275cm³ et aucun des chiens ne montrait des signes de métastases au début de l'étude. Un taux total de réponse de 25% fut obtenu suite à l'injection hebdomadaire réalisée pendant 12 semaines, taux qui inclue 3 chiens ayant eu une régression tumorale complète et un chien ayant eu une régression tumorale partielle (entre 50% et 99% de la taille initiale du sarcome). Les deux gènes (*cIL-2* et *SEA*) étaient encodés sur le même plasmide et les traitements furent administrés aux doses de 240µg à 1920 µg

d'ADN par injection intra-tumorale. Les sarcomes des quatre chiens étaient infiltrés par une population lymphoplasmocytaire (lymphocytes B et T) et par des macrophages. De plus, les auteurs ont observé que ces 4 chiens portaient des sarcomes de grades faible ou intermédiaire et que leurs sarcomes avaient une taille plus petite ou égale à la taille moyenne des sarcomes portés par les chiens de l'étude. L'injection intra-tumorale répétée de liposomes codant pour cIL-2 et SEA n'a mené à aucun effet secondaire local ou systémique sévère (Thamm DH, 2003).

Une deuxième étude fut réalisée sur 26 chiens portant des mélanomes. La stratégie thérapeutique consistait à injecter dans les tumeurs des liposomes codant pour le superantigène « entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* » (SEB) et cGM-CSF ou codant pour SEB et cIL-2. Le taux total de réponse fut de 46% (12 / 26 chiens) et il était plus élevé dans le traitement des petits mélanomes que dans le traitement des mélanomes de plus grande taille. La toxicité fut absente ou minimale dans tous les chiens traités. Les mélanomes injectés étaient infiltrés par des lymphocytes T et des macrophages et la régression des mélanomes fut associée à une forte activité cytolytique des lymphocytes retrouvés dans la circulation sanguine des chiens traités. Les auteurs conclurent donc que la transfection de cellules canines de mélanomes avec les gènes de *SEB* et *cIL-2* ou *SEB* et *cGM-CSF* était capable d'induire une immunité locale ainsi qu'une immunité systémique dans un modèle canin de mélanome spontané (Dow S, 1998).

Ces deux études démontrent que la modification de cellules tumorales avec des gènes codant pour des superantigènes et des cytokines est capable d'induire une immunité antitumorale dans un modèle animal où les tumeurs sont spontanées. Ces résultats semblent donc être très encourageants quant au développement de stratégie thérapeutique similaire pour les humains atteints d'ostéosarcome ou de mélanome.

Une autre façon d'introduire des gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules cancéreuses consiste à mettre en contact ces cellules avec des vecteurs viraux. À cause des récents échecs attribués à leur utilisation, les vecteurs viraux font l'objet de plus en plus d'études ayant pour but de vérifier la sécurité reliée à l'utilisation de ces vecteurs dans des patients humains (Thomas CE, 2003) (Friedmann T, 2003) (Raper SE, 2003) (Williams DA, 2003) (Hacein-Bey-Abina S, 2003).

Par exemple, une étude dans un modèle canin de tumeur prostatique testait l'injection intra-tumorale d'adénovecteurs de 1^{ère} génération codant pour β -gal. Les injections ont été réalisées en passant à travers le rectum et en utilisant l'imagerie par ultrasons pour guider les aiguilles. Une biopsie était réalisée avant chaque injection de façon à créer un canal dans lequel les adénovecteurs pouvaient être relâchés. Les résultats démontrent que la protéine β -gal est exprimée dans des sites pouvant être éloignés de 7.5mm du canal d'administration, suggérant donc la capacité de l'adénovecteur de se disperser dans la masse de cellules tumorales à transduire. Par contre,

des écouvillons rectaux ainsi que des prélèvements de plusieurs organes furent transitoirement positifs pour la présence d'adénovecteurs mettant ainsi en évidence une dissémination non souhaitée des vecteurs à partir du site d'injection (Weld KJ, 2002).

Dans un deuxième temps, une étude cherchait à démontrer la sécurité reliée au traitement de tumeurs prostatiques humaines avec des adénovecteurs codant pour IL-2 et délivrés par la voie intra-tumorale. Douze patients humains atteints de cancers prostatiques à risque élevé ont été traités par injection intra-tumorale d'adénovecteurs (différentes doses : 1×10^9 , 5×10^9 ou 1×10^{10}) codant pour l'IL-2 un mois avant leur prostatectomie. L'étude a démontré que l'utilisation d'adénovecteurs (jusqu'à 1×10^{10} par dose) en injection intra-tumorale dans des cancers prostatiques humains à risque élevé n'induisait aucune toxicité jusqu'à un mois après le traitement. Seule une réponse inflammatoire (infiltration de lymphocytes T CD8+ et nécrose) a été observée aux sites d'injection ainsi que quelques faibles effets secondaires tels que de l'inconfort périnéal, de l'hématurie et un syndrome grippal chez deux patients ainsi que de la difficulté urinaire dans un seul patient (Trudel S, 2003).

6.3 Immunothérapie cellulaire locale du cancer à l'IL-2 (*ex vivo*)

Jusqu'à maintenant relativement peu d'études combinent l'administration d'IL-2 par la thérapie cellulaire en traitement du cancer dans des modèles canins.

Dans une de ces études, une équipe de chercheurs a testé l'utilisation de cellules xénogéniques comme véhicule pour délivrer localement l'IL-2 humaine. Les cellules xénogéniques utilisées étaient des cellules Véro, soit des fibroblastes de singe (*Cercopithecus aethiops*). Les cellules Véro sont bien caractérisées et leur usage en thérapie génique *in vivo* a été qualifié de sécuritaire puisqu'elles ont été utilisées pendant des années pour la vaccination contre la poliomyélite. Le fait d'utiliser des cellules ainsi caractérisées permet de diminuer les risques de variation des réponses ou d'effets secondaires résultant de préparations cellulaires de qualité changeante. Ces cellules modifiées produisant 1.1µg d'hIL-2 par jour par million de cellules ont été injectées dans des fibrosarcomes félines et des mélanomes canins préalablement traités par chirurgie et radiothérapie locales, à une dose de 3×10^7 cellules par injection (7 ou 8 injections par animal). Les résultats de cette étude démontrent que les chiens et les chats traités par chirurgie, radiothérapie locale et injections locales de cellules xénogéniques sécrétant un taux élevé d'hIL-2 connaissent moins de rechutes et survivent plus longtemps que les animaux témoins traités par chirurgie et radiothérapie locale seulement. De plus, les résultats indiquent que cette stratégie de traitement est sécuritaire puisque les seuls effets secondaires

fréquents reliés à cette stratégie étaient une inflammation locale ainsi qu'une élévation transitoire de la température des animaux. Les auteurs soumettent alors l'hypothèse que cette stratégie de traitement pourrait être efficace dans le traitement de cancers humains. Une étude clinique phase I était initiée en 1996 chez des humains atteints de cancers avec métastases (Quintin-Colonna F, 1996).

MÉTHODOLOGIE

Des lymphocytes canins de Beagle ont été isolés de la circulation sanguine périphérique, ont été mis en culture puis stimulés avec des mitogènes. Ensuite, leur ARNm total a été isolé et réverse transcrit en ADNc puis le gène de l'IL-2 canine a été amplifié par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Un vecteur navette a été construit en y insérant le gène de l'IL-2 canine. Ce gène a par la suite été séquencé. Ce travail a été effectué par Simon Authier lors d'un stage d'été dans le laboratoire du Dr Jacques Galipeau (figure 13).

J'ai ensuite inséré le gène séquencé à l'intérieur d'un plasmide rétrovecteur (AP2) pour créer un plasmide rétrovecteur codant pour l'IL-2 canine (pCanIL2-GFP). Par la suite, j'ai réalisé une co-transfection stable de la lignée encapsidatrice embryonnaire humaine de rein (293GPG) avec un plasmide codant pour la résistance à l'antibiotique zéomycine (pBléo) et pCanIL2-GFP afin d'obtenir une lignée cellulaire capable de produire des rétrovecteurs pseudotypés avec VSV-G et codant pour les protéines IL-2 canine et GFP (vCanIL2-GFP). La lignée cellulaire encapsidatrice 293GPG possède la caractéristique de produire des rétrovecteurs seulement lorsque la tétracycline est enlevée du milieu de culture. Suite à la sélection, j'ai déterminé le titre de la lignée encapsidatrice 293GPG transfectée (3×10^5 rétrovecteurs/ml) à l'aide de deux lignées cellulaires différentes (MDCK et A549) que j'ai exposées aux rétrovecteurs vCanIL2-GFP puis analysées par FACS (cytométrie de flux) (figure 13).

Quatre lignées cellulaires tumorales canines ont ensuite été transduites avec les rétrovecteurs vCanIL2-GFP. Chaque transduction a été réalisée avec un multiple d'infection (MOI) de 2.7 à 4. Les lignées tumorales canines étudiées dérivait d'un adénocarcinome mammaire (Dr J. Sirois et Dre M. Doré, FMV, Université de Montréal), d'un adénocarcinome de la prostate (Dr J. Sirois et Dre M. Doré, FMV, Université de Montréal), d'un carcinome spinocellulaire (Dr J. Sirois et Dre M. Doré, FMV, Université de Montréal) ainsi que d'une tumeur stromale de l'ovaire (Dre A. E. Stock, FMV, Université de Montréal). Chaque lignée tumorale transduite a été analysée pour l'expression et le relâchement de la protéine IL-2 canine dans le surnageant des lignées en culture (analyse de Western) et pour la fonctionnalité de la protéine IL-2 canine relâchée dans le surnageant des lignées transduites (figure 13).

Les essais fonctionnels ont été réalisés avec une lignée de lymphocytes T murins qui dépendent de l'IL-2 pour survivre et proliférer en culture. Les analyses ont démontré que le gène de l'IL-2 canine était intégré de façon stable dans chacune des quatre lignées tumorales transduites par les rétrovecteurs psevCanIL2-GFP, que ces cellules étaient aptes à exprimer ce gène et à relâcher la protéine IL-2 canine dans l'environnement extracellulaire et que cette IL-2 canine était fonctionnelle.

Enfin, des cellules stromales de la moelle osseuse canine (CSMOc) ont été prélevées d'un chien de race Beagle (femelle de 1 an et 3 mois) puis mises en culture et exposées aux rétrovecteurs vCanIL2-GFP. Les mêmes analyses d'expression et de sécrétion de la protéine IL-2 canine dans le surnageant des cellules stromales en culture et de la fonctionnalité de l'IL-2 canine secrétée ont été réalisées et les mêmes résultats ont été obtenus, c'est-à-dire que le gène était exprimé sous forme fonctionnelle et libéré dans son environnement extra-cellulaire.

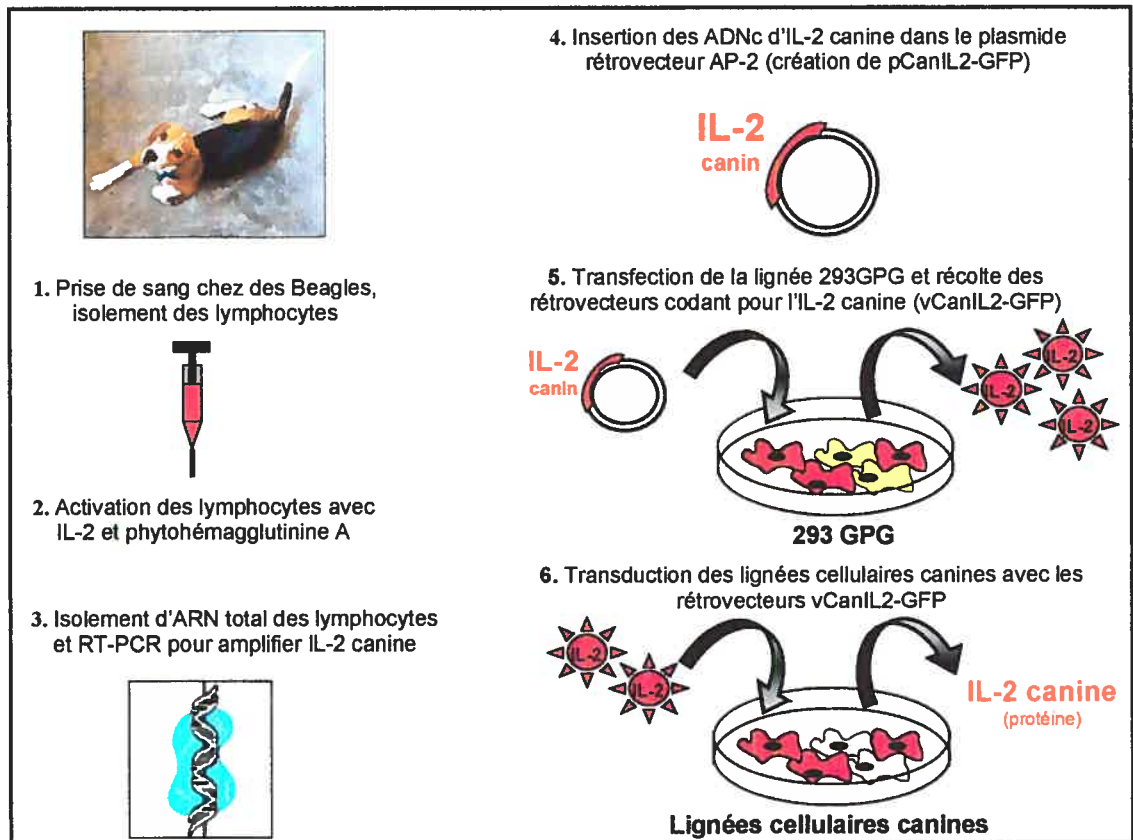


Figure 13. Schéma de vue d'ensemble du projet « Immunothérapie génique de cancers spontanés canins par l'IL-2 délivrée par des rétrovecteurs ». Des prises de sang effectuées chez des chiens de race Beagle ont permis d'isoler des lymphocytes canins (**étape 1**), lesquels ont par la suite été activés en culture à l'aide d'IL-2 et de phytohémagglutinine A (**étape 2**). L'ARN total des lymphocytes activés a été isolé puis soumis à une reverse transcription. L'ARN total reverse transcrit a ensuite été soumis à une réaction de polymérisation en chaîne afin d'amplifier le gène de l'IL-2 canine (**étape 3**). Une fois amplifié, le gène d'IL-2 canine a été inséré dans un plasmide navette nommé pGEM-T (**étape non illustrée**) afin d'être soumis à un séquençage. Le gène séquencé correspondant à l'IL-2 canine fut ensuite inséré dans un plasmide rétrovecteur nommé AP-2 (**étape 4**), plasmide codant pour les deux LTRs du génome des rétrovecteurs ainsi que pour le gène d'encapsidation (gène rétroviral) et le gène IRES (site d'entrée ribosomal interne) pour ainsi créer le plasmide rétrovecteur codant pour l'IL-2 canine nommé pCanIL2-GFP. Le plasmide pCanIL2-GFP fut ensuite utilisé pour transfecter la lignée cellulaire encapsidatrice 293GPG (**étape 5**). Cette lignée cellulaire en est une embryonnaire humaine de cellules rénales possédant les trois gènes essentiels au procédé d'encapsidation des rétrovirus, soit les

gènes gag, pol et env. De plus, la lignée cellulaire 293GPG possède le gène codant pour VSV-G, soit la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse. La protéine VSV-G, une fois positionnée à la surface des rétrovecteurs, élargit le spectre des types cellulaires pouvant être transduits par les rétrovecteurs. Une fois transfectées, les cellules 293GPG furent maintenues en culture afin de récolter de grandes quantités de rétrovecteurs. Finalement, les rétrovecteurs récoltés furent mis en contact avec les différentes lignées cellulaires canines afin de procéder à leur transduction (**étape 6**). Les cellules transduites furent maintenues en culture pour différentes analyses : analyse cellulaire (cytométrie de flux) et protéique (Western Blot et analyse fonctionnelle de l'IL-2 canine).

Efficient transduction of canine cells with canine IL-2 using a VSV G-pseudotyped oncovector

Bianca Morel^a, Hélène Boucher^a, Simon Authier^b, Guy Beauchamp^a, Jacques
Galipeau^b, Daniel Martineau^a

^aD  partement de Pathologie et Microbiologie, ^bD  partement de biom  decine
vétérinaire, Faculté de Médecine V  t  rinaire, Université de Montréal, Saint-
Hyacinthe, PQ, Canada, J2S 7C6 ^cLady Davis Institute, Sir Mortimer B. Davis
- Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1E2.

Abstract

The key role played by interleukin-2 (IL-2) in cell-mediated immunity against cancer has led to the use of this cytokine in the standard treatment of human patients affected by renal cell carcinoma and malignant melanoma. The intratumoral implantation of cells genetically modified *ex vivo* to produce cytokines such as IL-2 is a promising therapeutic approach to trigger tumor regression. It avoids the toxicity inherent to the systemic administration of powerful cytokines, maintains stable physiological levels of the cytokine within the tumor microenvironment for prolonged periods and avoids multiple injections. As a first step in treating canine cancers using this approach, we transduced primary canine cells (primary bone marrow stromal cells) and canine tumor cells (mammary and prostate adenocarcinoma and squamous cell carcinoma) with canine IL-2 using a VSV-G pseudotyped oncovector. The transduced cells all released significant amounts of biologically active IL-2 *in vitro*. This study provides new tools for clinical trials of *ex vivo* gene therapy in dogs affected by spontaneous cancers.

Abbreviations

α FGF, alpha fibroblast growth factor; BMSC, primary bone marrow stromal cells; cIL-2, canine interleukin-2; CMT2, canine mammary adenocarcinoma; CMV, cytomegalovirus; CPA, canine prostate adenocarcinoma; CSOT, canine stromal ovarian tumor; CTLL-2, IL-2 dependent murine T-cell line; DMEM, Dubelcco's Modified Eagle Medium; EGF, epidermal growth factor;

eGFP, enhanced green fluorescent protein; IL-2 , interleukin-2 ; IP, iodure propidium; IRES, internal ribosomal entry site; LTRs, long terminal repeat; MSCV, murine stem cell virus; rhIL-2, recombinant human interleukin-2 ; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; SCC, squamous cell carcinoma; VSV-G, G glycoprotein of vesicular stomatitis virus

1. Introduction

IL-2, a cytokine produced primarily by activated CD4⁺ T cells, plays an essential role in cell-mediated immunity against cancer cells by promoting the activation and proliferation of CD8⁺ T lymphocytes and NK cells which, once activated by IL-2, can destroy tumor cells (Fehniger et al., 2002). The encouraging results obtained in rodent models and in human and veterinary clinical trials led to the inclusion of systemic administration of recombinant human IL-2 (rhIL-2) in the standard therapeutic regimen for certain cancers (Kim et al., 2003). Unfortunately, high doses of systemic rhIL-2 cause serious toxic effects such as hypotension and generalized increased vascular permeability (Rosenberg SA, 2001). Smaller systemic doses are tolerated but have diminished therapeutic effects, probably because IL-2 concentrations within the tumor microenvironment are not sufficient to activate immune cells (Yang JC et al., 2003).

The intratumoral inoculation of IL-2 avoids the systemic toxicity of parenterally administered IL-2 and, instead of sustained physiological levels, results in widely spaced bursts of supraphysiological exposures of immune cells to that cytokine. In contrast, the intratumoral implantation of cells engineered to release IL-2, i.e. the combination of gene therapy with cell therapy, provides physiological levels over prolonged periods, which resembles more closely the normal *in vivo* production of IL-2 by activated T cells (Glick et al., 2003; Lichtor and Glick 2003).

The use of engineered cellular implants in the clinic will necessitate that target cells are easily accessible, collected in large numbers and expandable to large numbers *in vitro*. Bone marrow stromal cells (BMSC), also termed mesenchymal stem cells, and some tumor cells fulfill these criteria. Canine BMSCs (cBMSCs) have been only partially characterized. They can be retrovirally transduced albeit with moderate efficiency (Cherington et al., 1998), and, to our knowledge, have not been transduced with any cytokine.

Tumor cells present a variety of potential antigens susceptible of activating cytotoxic cells. They can be expanded in large numbers and selected for the expression of immunogenic antigens. For these reasons, the use of tumor cells (irradiated or treated with antimetabolic compounds) as cancer vaccines has been investigated (Armstrong and Jaffee 2002; Fearon et al., 1990).

Several factors favour the use of IL-2 engineered allogeneic cells over that of autologous cells. The intratumoral implantation of allogeneic cells provides a more vigorous immune response than the implantation of syngeneic or autologous cells, which may contribute to tumor regression. In addition, sustained exposure to IL-2 leads to apoptosis of lymphocytes. For that reason, the destruction of implanted IL-2-producing cells after a limited period may be beneficial (Quintin-Colonna et al., 1996). In addition, engineered allogeneic cells can be cryopreserved and inoculated as needed

while in contrast autologous cells must be isolated, engineered and expanded from individual patients every time they are needed.

Retrovectors have been the most widely used viral vectors for gene transfer owing to their capacity for efficient, rapid and stable integration of therapeutic genes in the genome of dividing target cells (Wolfgang, 1994). These vectors, pseudotyped with the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus (VSV-G) have a wide tropism, are resistant to complement and can be concentrated to high titers (Burns et al., 1993).

Canine models are more realistic than laboratory rodents for testing new therapeutic approaches of cancer for several reasons. The canine genome shares more features with the human genome compared to the rodent genome (Sutter and Ostrander 2004). In addition, dogs resemble humans by their physiology, longevity, genetic heterogeneity and their wide range in body weight. Most importantly, the type and behaviour of many spontaneous canine cancers – in particular their slow development - are similar to those of many human cancers. Notable examples include melanomas, mammary carcinomas, cutaneous squamous cell carcinomas, osteosarcomas and hemangiosarcomas (Kirkness et al., 2003; Vail et al., 2000)

As a first step toward clinical trials of engineered cellular implants in dogs affected with cancer, our objective was to demonstrate that canine cells – both normal and tumoral - can be genetically modified rapidly and efficiently to produce and release functional canine IL-2. We determined the

susceptibility of four canine cancer cell lines and primary cBMSCs to oncovector-mediated transduction with canine IL-2.

2. Materials and methods

2.1 Canine IL-2 cDNA cloning and retrovector design

EDTA-anticoagulated whole blood (11 ml) was collected from a dog, mixed with RPMI (11ml) and centrifuged on a Ficoll cushion. The interface was collected, washed twice with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium and resuspended in RPMI with 10 % FBS (10^6 cells /ml) containing rhIL-2 (IL-2, Chiron, Emeryville, CA) (200 U/ml) in 25 cm²-flasks. To activate T cells and trigger the expression of canine IL-2, phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) (2 μ g/ml) was added 24 h after blood collection and kept in the medium for 4 days. Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen/Gibco, Burlington, Ont., Canada) 11 days after collection, treated with DNase and phenol-chloroform purified. cDNA was synthesized using oligo d(T) and reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen). Canine IL-2 cDNA was amplified by PCR (2-min denaturation at 95°C followed by 94°C for 1 min, 63 °C for 1 min, 72°C for 1 min, 35 cycles, ending with 10 min at 72°C) using canine IL-2-specific primers CF and BA (Table 1) and Taq Platinum HiFi (Invitrogen). The expected 583-bp fragment was gel-purified (Qiaquick, Qiagen, Mississauga, Ont., Canada) and reamplified under the same PCR conditions with nested primers FO2 and BA1 (Table 1). The

expected 485-bp product was excised, gel purified, treated with Taq polymerase and dATP (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc, Canada) and subcloned in pGemT Easy Vector (Promega, Madison WI) to form the pCanIL-2 plasmid.

AP-2, a bicistronic retrovector, contains a *XhoI* - *BamHI* cDNA multiple cloning site located upstream of the enhanced green fluorescent protein (eGFP) marker gene, from which it is separated by an internal ribosomal entry site (IRES) sequence (Galipeau et al., 1999). To insert the canine IL-2 cDNA into AP-2, a PCR reaction (34 cycles, 3-min denaturation at 95 °C followed by 94 °C for 30 sec, 65 °C for 30 sec, 68 °C for 1 min ending with 10 min at 68°C) was carried out on pCanIL-2 using primers FOX and BAB bearing *XhoI* (5' end) and *BamHI* (3' end) restriction sites (Table 1). The resulting product was digested with *XhoI* and *BamHI* and inserted into the *XhoI*-*BamHI*-cut AP-2, generating plasmid pCanIL2-GFP (Fig. 1). Transfection of the 293GPG packaging cells leads to the production of retroviral particles carrying the therapeutic and reporter genes (vCanIL2-GFP). Transduction of target cells with these retroviral particles leads to the stable incorporation into the genomic DNA of the canine IL-2, IRES and eGFP sequence flanked by murine stem cell virus (MSCV) long terminal repeat (LTRs). In the packaging cell line, the expression of these genes is driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter whereas in target cells, it is under the control of the retroviral 5' LTR.

2.2 Production of VSV-G-Pseudotyped Retroviral Particles

The human embryonic kidney 293GPG retroviral packaging cell line [kindly provided by R.C Mulligan (Children's Hospital, Boston, MA)] was stably transfected with pCanIL2-GFP to generate VSV-G pseudotyped retrovectors (Ory et al., 1996). A stable polyclonal producer cell population was obtained by cotransfecting 10 µg of *Sac*II-linearized retrovector plasmid pCanIL2-GFP and 3 µg of *Pvu*I-linearized pJ6ΩBleo plasmid (Morgenstern et al., 1990), generous gift from Dr. Richard Mulligan (Children's Hospital, Boston, MA). Transfected cells were maintained in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10 % FBS supplemented with 300 µg/ml G418 (Wisent Inc., St-Bruno, Qc., Canada), 2 µg/ml puromycin and 1 µg/ml tetracycline (Sigma-Aldrich) and selection was carried out by supplementing the media with 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen/Gibco). The supernatant was collected from transfected 293 GPG when control untransfected 293GPG cells were all dead, filtered (0.45 µm filters (VWR Canlab, Mont-Royal, Qc., Canada)) and stored at -80°C.

Viral titers (defined as the number of infectious particles/ml of supernatant) were determined using two target cell lines (MDCK and A549 lung carcinoma cells, both cultured in DMEM, 10 % FBS, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Wisent Inc.)). Target cells were plated in 6-well tissue culture dish at 4×10^4 cells/well (day 1), and were incubated the following day with serial dilutions of viral supernatant in DMEM, 10 % FBS with 6 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich). On day 3, the supernatant

(containing the retroviral particles) was removed and replaced with fresh media. The percentage of transduced eGFP-positive cells was determined by flow cytometry analysis on day 6. Viral titers were calculated as % of eGFP positive cells x initial cell count x dilution factor per ml of supernatant applied.

2.3 Canine cells

Four canine cancer cell lines and primary canine BMSCs were transduced. Canine squamous cell carcinoma cells (SCC) were maintained in William's Medium E (Sigma Aldrich), 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Wisent inc.), 0.01 µg/ml epidermal growth factor (EGF) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, Canada) and 8.3 ng/ml cholera toxin (Sigma Aldrich) (Suter et al., 1991). Canine mammary adenocarcinoma cells (CMT2) were maintained in Leibovitz's L-15, 10 % FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Wisent Inc.), 0.02 µg/ml EGF (Peprotech) and 1:100 HEPES (Invitrogen/Gibco) (Wolfe et al., 1986). Canine prostate adenocarcinoma cells (CPA) were maintained in DMEM, 10% FBS, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Wisent Inc.) (Eaton et al., 1988). Canine stromal ovarian tumor cells (CSOT) were maintained in 50 % DMEM, 50 % Ham's F12 (Invitrogen/Gibco), 10 % FBS (Wisent Inc.), HEPES (20 mM) supplemented with MEM non essential amino acids (0.1 mM) ((Invitrogen/Gibco), 5 µg/ml apo-transferrin, 100 ng/ml hydrocortisone, 4 ng/ml sodium selenite, 50 ng/ml 17β-estradiol (Sigma-Aldrich), 100 U/ml

penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamycin (Invitrogen/Gibco).

Canine BMSC were obtained by standard bone marrow aspiration from the humeral crest of healthy isoflurane-anesthetized Beagle dogs. Following aspiration, the bone marrow was diluted 1:3 with DMEM and layered onto Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia). Following centrifugation at 400 x g for 30 min at 22°C, the interface layer, containing mononuclear cells, was collected and washed once in DMEM. After a second centrifugation (200 x g, 10 min), the pelleted cells were resuspended in DMEM, 16% FBS, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 250 ng/ml amphotericin B (Wisent Inc.), 1 ng/ml human recombinant alpha fibroblast growth factor (α FGF) (R&D system, Minneapolis, Minnesota) and 5 U/ml heparin sodium salt (Sigma Aldrich). They were cultured in the same medium in 1% bovine gelatine (Sigma Aldrich) -coated plates at 37°C in a high humidity incubator with 5 % CO₂.

2.4 Transduction of Canine cell lines

Cells were plated in 6-well dishes (canine cancer cell lines: 8 X 10⁴ cells/well and canine BMSC: 4 X 10⁵ cells/well) (day 1) and allowed to adhere and proliferate for 2 days (days 2 and 3). On day 4, the culture medium was removed and replaced with 1.5 ml/well of thawed virus-containing supernatant supplemented with 6 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich). This procedure was repeated 2 (cBMSCc) or 3 times (cancer cell lines).

Exposures to viral supernatant were 6 h long and separated by 3 h incubation in the appropriate complete media. After the last exposure, the cells were kept in appropriate complete media for 48 h and analyzed by flow cytometry. This protocol was repeated three times for cBMSCs and SCC and 4 times for CMT2, CPA and CSOT cell lines.

2.5 Flow Cytometry Analysis

Analyses were performed on a FACScan™ (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) with the CellQuest software. Two days after transduction, cells were trypsinized and resuspended in PBS at $\sim 10^5$ cells/ml. Iodine propidium (Sigma Aldrich) was added at a final concentration of 1 μ g/ml to cell suspensions to detect and exclude dead cells from FACS analysis. Live (IP negative) cells were gated and analysed for eGFP fluorescence.

2.6 Western Blot Analysis

The cell lines were incubated 24 h in their respective culture medium without FBS and antibiotics after which the supernatant was filtered on 0.22 μ m filter and concentrated 100-fold using Centriplus YM-10 columns (cut-off 10 000MW, Fisher Scientific, Nepean, Ont., Canada). Total protein concentration of filtered and concentrated supernatants was measured by the Bradford method using Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ont., Canada) according to

manufacturer's protocol, and the concentrated supernatants were stored at -20°C.

Fifty to 400 µg of protein were loaded onto a 12% acrylamide gel. rhIL-2 (750 U) was used as a positive control. Samples were allowed to migrate (1 h, 200 Volts) and transferred onto a nitrocellulose membrane (2 h, 100 Volts). Then, the membrane was blocked with 5% milk solution (Blotto), incubated first with an anti human α IL-2 rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology inc., Santa Cruz, CA) diluted 1:400 in Blotto (overnight at 4°C), and subsequently incubated 2 h with goat anti-rabbit horseradish peroxidase (GAR-HRP) antibody (Bio-Rad) diluted 1:3000 in Blotto. To detect the signal, the membrane was incubated with Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and exposed on a radiographic film (BioMax MR, Kodak, Rochester, NY).

2.7 Bioassays

The concentrated (concentration factor ranging from 0.1X to 5X) supernatants used for Western blot analysis were also utilized for functional assays. The bioactivity of the canine IL-2 protein was determined by measuring the proliferation of an IL-2 dependent murine T-cell line (CTLL-2) using Alamar blue (BioSource International, Camarillo, CA) (Belani and Weiner 1996). Serum-free supernatants of all tested canine cells were analyzed using the identically concentrated supernatant from untransduced canine cancer cells or cBMSC as negative control. CTLL-2 cells, plated at the

initial density (2×10^4 cells/well), were incubated with the concentrated supernatants in 96-well tissue culture plates for 44 h after which Alamar blue was added at a final concentration of 10% v/v and was allowed to react over a 4-h period. Fluorescence was measured with a fluorometer instrument (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies, Inc., Durham, NC). The amount of functional canine IL-2 produced by each transduced canine cancer cell lines and by primary transduced cBMSC was determined from a linear regression analysis made on a rhIL-2 standard curve (concentrations ranging from 1.25 U/ml to 40 U/ml). Each assay was carried out three times.

The supernatants from cancer cells and cBMSCs was assayed 3 times and 4 times respectively.

2.8 Statistical analysis

Transduction efficiency (% of cells producing eGFP after transduction) and IL-2 production by the different cell lines and primary cells were compared by the nonparametric Kruskal-Wallis test using SAS version 9.0 (Cary, N.C.).

3. Results

3.1 Cloning of canine IL-2 (cIL-2) and production of retrovectors

A titer of 3.4×10^5 particles / ml was measured in the supernatant of the 293GPG packaging cell line stably transfected with pCanIL2-GFP as shown by flow cytometry analysis. Packaging cells produced and released

functional canine IL-2 as determined by Western blot analysis and by CTLL-2 bioassay carried out on their supernatant (data not shown).

3.2 Transduction efficiency of canine cells

Canine cells were heterogeneous regarding transduction efficiency as measured by eGFP activity (Fig. 3). Transduction efficiency means ranged from 35 to 67 % (Fig. 3). CMT2 cells showed the highest efficiency as confirmed by the Kruskal-Wallis post hoc test.

3.3 Production of canine IL-2 by transduced canine cells

All canine cells that were assayed produced IL-2 until more than 2 weeks after transduction as shown by Western blot analysis (Fig. 4). In all transduced canine cells, cIL-2 was detected at approximately 20 kDa. An additional band, 17 kDa in CMT2, CPA and cBMSC, and 16 kDa in CSOT most likely represented non glycosylated IL-2.

3.4 Biological activity and quantitation of transduced canine IL-2

All transduced canine cells that were tested produced and released biologically active cIL-2 (15 to 1550 U of equivalent rhIL-2 activity per million of transduced cells per day (Fig. 5)). After normalizing this activity relative to transduction efficiency, supernatant from transduced CSOT cells showed the highest IL-2 activity levels as confirmed by the Kruskal-Wallis test.

4. Discussion and conclusion

There were significant differences between different canine cell types regarding gene transduction efficiency (Fig. 3). Every step of the retroviral cycle may be involved in these differences. For instance, cellular receptors specific for the viral envelope protein must be present at the surface of target cells to allow the entry of viral RNA into the cytoplasm. The receptor for VSV-G is ubiquitous in mammalian cells but its abundance depends on cell type. In addition, target cells must enter mitosis soon after viral entry to allow integration of viral cDNA into the host cell genome, and the doubling time of the cell lines we studied varied widely (Miller et al., 1990). Thus integration could have been less efficient in the cell lines growing more slowly. Finally, the transcriptional control elements present within the LTR U3 region determine whether the reporter gene will be expressed in a given cell type.

Finally, the nature of the therapeutic gene inserted in the target cells may also play a role. For instance, it is known that the growth of squamous carcinoma cells is inhibited by IL-2 (Gröne A. 2002). Thus, it is possible that SCC are efficiently transduced and produce initially high levels of IL-2 but that their growth is inhibited by the presence of endogenously produced IL-2, and that they become outnumbered by untransduced cells whose growth could be less inhibited by IL-2 because the cytokine is present only in the extracellular milieu (Weidmann et al., 1992).

The amount of canine IL-2 produced by CPA, CSOT and cBMSCs was comparable to the amount of human IL-2 produced by other mammalian cells

(550 U to 4500 U per 10^6 cells/24 hours) (Conradt et al., 1989). Considering that IL-2 undergoes various posttranslational modifications such as glycosylation and sialylation, the presence of two different forms of secreted IL-2 as detected by Western blot was expected (Fig. 4) (Conradt et al., 1989). Based on the production of human IL-2 by other mammalian cells, the two bands most likely represented the glycosylated and non glycosylated forms. Like other IL-2 engineered mammalian cells, canine cells produced predominantly the higher molecular weight- glycosylated form (Fig. 4) (Conradt et al., 1989).

We showed that tumor and normal canine cells can be efficiently engineered *in vitro* to produce significant levels of functional IL-2 using a VSV-G pseudotyped oncoretrovector. Canine bone marrow stromal cells (cBMSCs) in particular were efficiently transduced and produced relatively high levels of IL-2. Future work will aim at optimizing the intratumoral implantation of IL-2- engineered cBMSCs or tumor cells either irradiated or treated with antimitotic compounds, and at determining the capacity of implanted cells to induce or increase intratumoral inflammation and trigger tumor regression.

Acknowledgements

We are grateful to Drs H.E. Jones (Cardiff University) (CPA), E.A. Sartin (Auburn University) (CMT2), J. Sirois, A.E. Stock (University of Montreal) (CSOT) and M.M. Suter (University of Berne) (SCC), for the

generous gift of the canine tumor cell lines. We thank L. Lejeune, J. Stagg (Lady Davis Institute, Montreal), F. Fontaine and A. Duval (University of Montreal) for useful discussions and M. Langlois for technical assistance with figures. This work was supported by NSERC operating grant 138236-01 and VRQ project 2200-037. B.M. was supported by Fonds du Centenaire of Faculté de Médecine Vétérinaire (Université de Montréal).

References

- Armstrong, T.D., Jaffee, E.M., 2002. Cytokine modified tumor vaccines. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11, 681-696.
- Belani, R., Weiner, G.J., 1996. Expression of both B7-1 and CD28 contributes to the IL-2 responsiveness of CTLL-2 cells. *Immunology.* 87, 271-274.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J-K., 1993. Vesicular stomatitis virus G glucoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8033-8037.
- Cherington, V., Chiang, G.G., McGrath, C.A., Gaffney, A., Galanopoulos, T., Merrill, W., Bizinkauskas, C.B., Hansen, M., Sobolewski, J., Levine, P.H., Greenberger, J.S., Hurwitz, D.R., 1998. Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX in vitro and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion. *Hum. Gene Ther.* 9, 1397-1407.
- Conradt, H.S., Nimitz, M., Dittmar, K.E., Lindenmaier, W., Hoppe, J., Hauser, H., 1989. Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney, Ltk-, and Chinese hamster ovary cells. Structure of O-linked

carbohydrate chains and their location within the polypeptide. *J. Biol. Chem.* 264, 17368-17373.

Eaton C.L., Pierrepont C.G., 1988. Growth of a spontaneous canine prostatic adenocarcinoma in vivo and in vitro: isolation and characterization of a neoplastic prostatic epithelial cell line, CPA 1. *Prostate* 12, 129-143.

Fearon E.R., Pardoll D.M., Itaya T, Golumbek P, Levitsky H.I., Simons J.W., Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P., 1990. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell.* 60, 397-403.

Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Caligiuri, M.A., 2002. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 169-183.

Galipeau, J., Li, H., Paquin, A., Sicilia, F., Karpas, G., Nalbantoglu, J., 1999. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* 59, 2384-2394.

Glick, R.P., Lichtor, T., Panchal, R., Mahendra, A., Cohen, E.P., 2003. Treatment with allogeneic interleukin-2 secreting fibroblasts protects

- against the development of malignant brain tumors. *J. Neurooncol.* 64, 139-146.
- Gröne, A., 2002. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 1-12.
- Kim, H., Beldegrun, A.S., Figlin, R.A., 2003. Immune gene therapy for kidney cancer: the search for a magic trigger. *Mol. Ther.* 7, 153-154.
- Kirkness, E.F., Bafna, V., Halpern, A.L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D.B., Delcher, A.L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C.M., Venter, J.C., 2003. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301, 1898-1903.
- Lichter, T., Glick, R.P., 2003. Cytokine immuno-gene therapy for treatment of brain tumors. *J. Neurooncol.* 65, 247-259.
- Miller, D.G., Adam, M.A., Miller, A.D., 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239-4242.
- Morgenstern, J.P., Land, H., 1990. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res.* 18, 1068.

- Ory, D.S., Neugeboren, B.A., Mulligan, R.C., 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1400-1406.
- Quintin-Colonna, F., Devauchelle, P., Fradelizi, D., Mourot, B., Faure, T., Kourilsky, P., Roth, C., Mehtali, M., 1996. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther.* 3, 1104-1112.
- Rosenberg, S.A., 2001. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J. Intern. Med.* 250, 462-475.
- Schmidt, W., Schweighoffer, T., Herbst, E., Maass, G., Berger, M., Schilcher, F., Schaffner, G., Birnstiel, M.L., 1995. Cancer vaccines: The interleukin 2 dosage effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4711-4714.
- Suter, M.M., Pantano, D.M., Flanders, J.A., Augustin-Voss, H.G., Dougherty, E.P., Varvayanis, M., 1991. Comparison of growth and differentiation of normal and neoplastic canine keratinocyte cultures. *Vet. Pathol.* 28, 131-138.

- Sutter, N.B., Ostrander, E.A. 2004. Dog star rising: the canine genetic system. *Nat. Rev. Genet.* 5, 900-910.
- Vail, D.M., MacEwen, E.G., 2000. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 18, 781-792.
- Weidmann, E., Sacchi, M., Plaisance, S., Heo, D.S., Yasumura, S., Lin, W.C., Johnson, J.T., Herberman, R.B., Azzarone, B., Whiteside, T.L., 1992. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor *in situ*. *Cancer Res.* 52, 5963-5970.
- Wolfe, L.G., Buxton Smith, B., Toivio-Kinnucan, M.A., Sartin, E.A., Kwapien, R.P., Henderson, R.A., Barnes, S., 1986. Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 783-792.
- Wolfgang, U., Wolfgang, W., 1994. Retrovirus-mediated gene transfer in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 63, 323-347.
- Yang, J.C., Sherry, R.M., Steinberg, S.M., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., White, D.E.,

Liewehr, D.J., Merino, M.J., Rosenberg, S.A., 2003. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 3127-3132.

Table 1.

Primers used for the amplification and subcloning of canine IL-2 cDNA in AP-2 retrovector (positions and sequences based on canine IL-2 cDNA sequence (Genbank D30710)).

NAME	SEQUENCE	POSITION
CF	ACAGTAACCTCAACTCCTGCCACA <u>ATGTA</u>	8-36 Start codon underlined
BA	CAAAGGTAGCAAACGTACATC	590-567
BA1	GGCACTTAATTAT <u>CAAGTCAGTGTTGAGA</u>	511-483 Stop codon underlined
FO2	CCACA <u>ATGTACAAAATGCAACTC</u>	27-50 Start codon underlined
FOX	GCGC <u>CTCGAGATGTACAAAATGCAACTC</u>	32-49 <i>XhoI</i> site underlined
BAB	GCGG <u>GATCCTTATCAAGTCAGTGTTGAG</u>	502-484 <i>BamHI</i> site underlined

Figure 1. Representation of retrovector plasmid pCanIL2-GFP encoding for canine IL-2 and eGFP in a bicistronic framework.

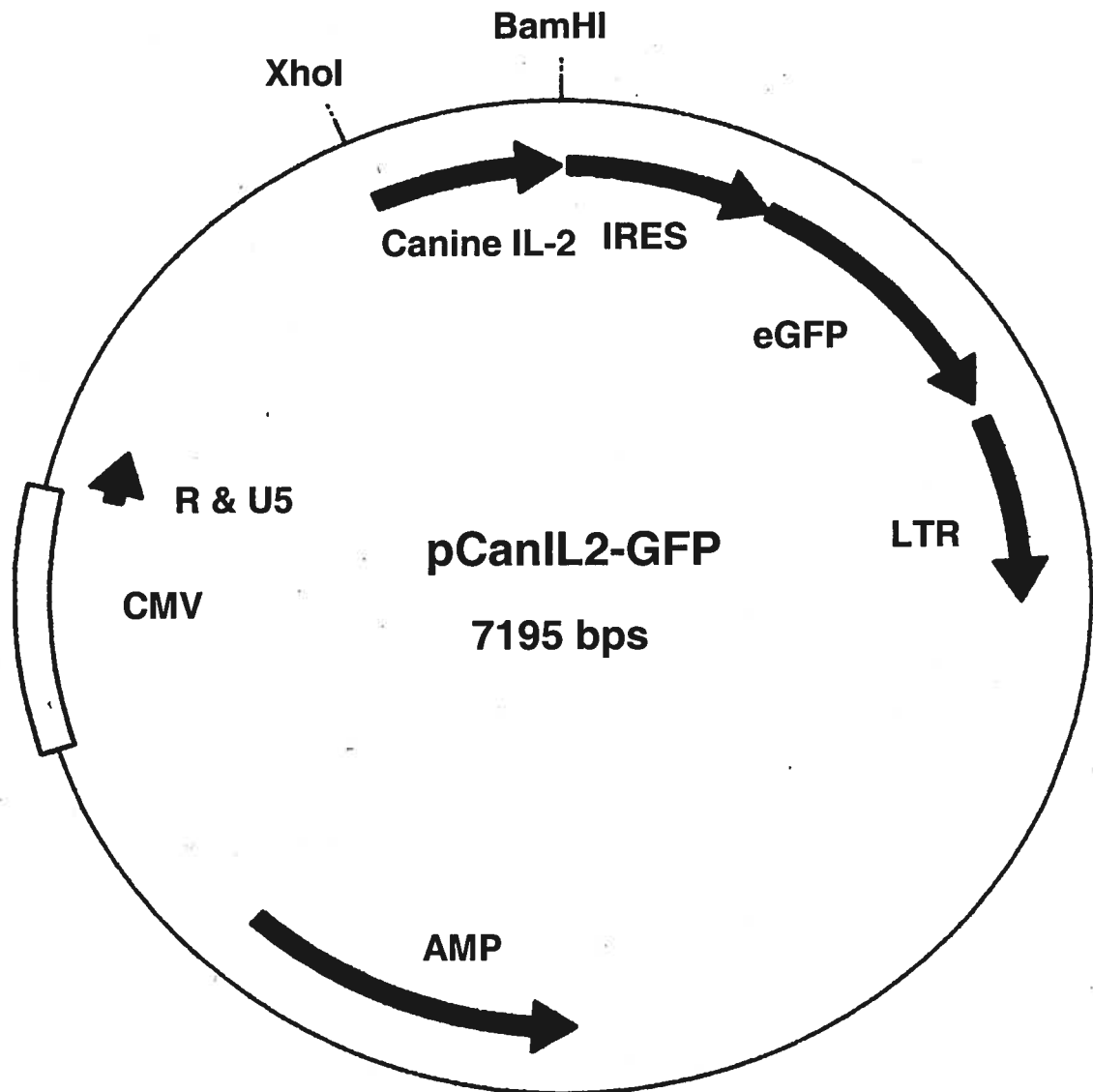


Figure 2. Flow cytometry analysis. CMT2 were transduced with vCanIL2-GFP retroviral particles at a MOI of 2.7 and subsequently analyzed for green fluorescence by flow cytometry. More than half (61 %) of transduced CMT2 (right panel. R2) demonstrate high levels of fluorescence when compared with null CMT2 (left panel).

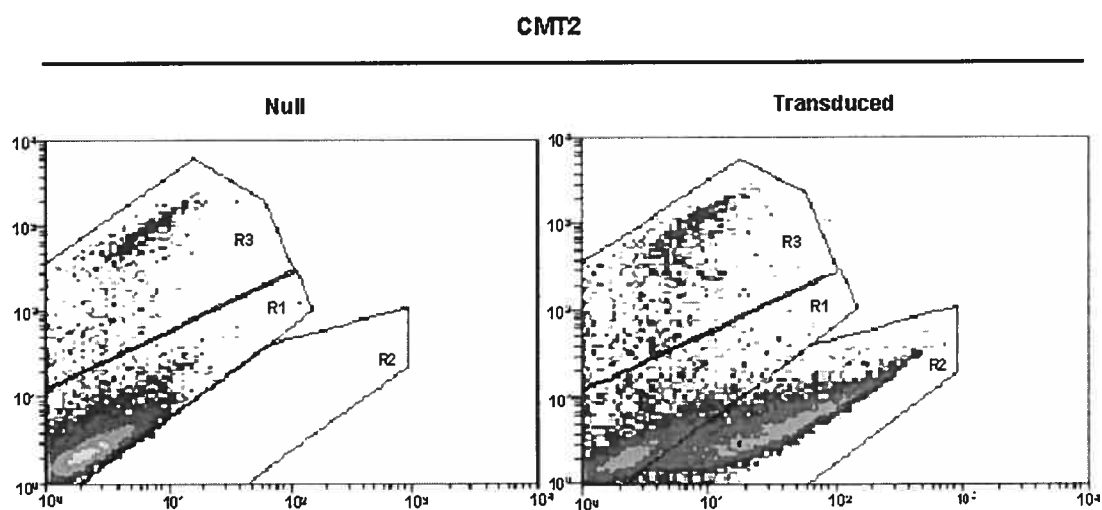


Figure 3. Transduction efficiency of canine cancer cell lines and cBMSCs.

Each cancer cell line was exposed 3 times to vCanIL2-GFP retroviral particles and cBMSCs were exposed 2 times. The horizontal lines within the boxes represent the median. Top and bottom of boxes represent the third and first quartile respectively.

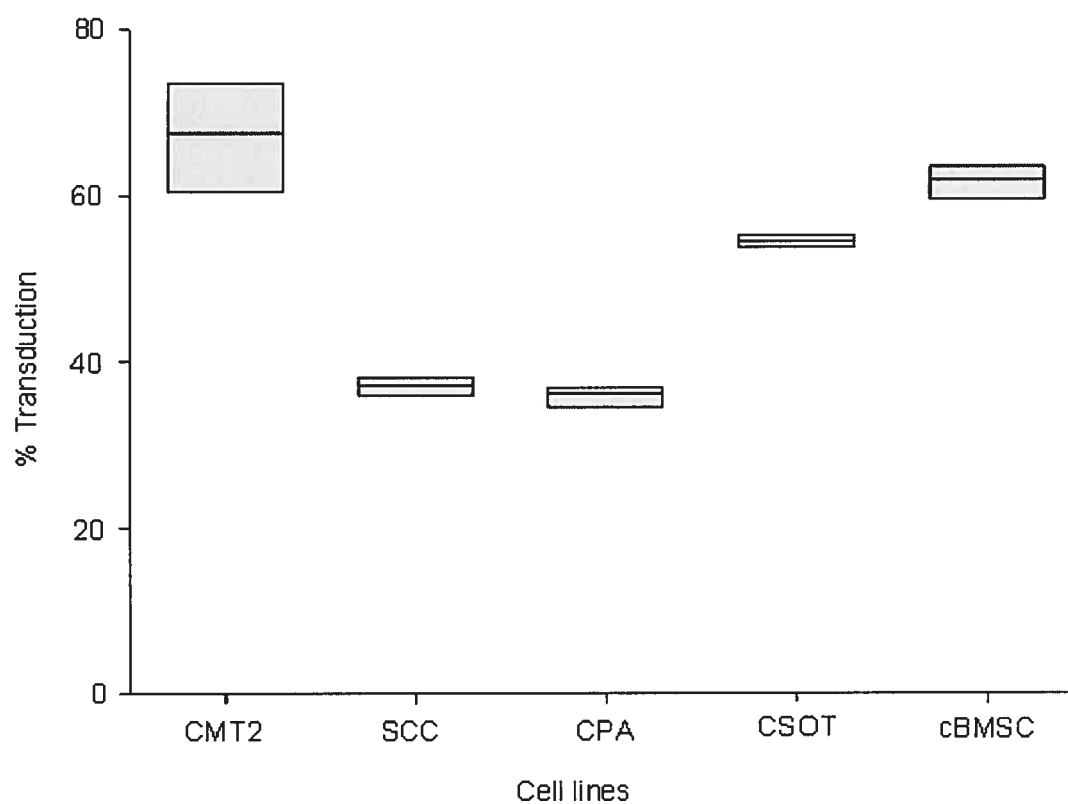


Figure 4. Western Blot analysis of concentrated supernatants from vCanIL2-GFP-transduced canine cancer cell lines and cBMSCs. A) Lane A: Positive control: rhIL-2 (750 U = 0.04 μ g). Lane B: untransduced CMT2 (150 μ g). Lane C: transduced CMT2 (150 μ g). Lane D: untransduced CPA (115 μ g). Lane E: transduced CPA (115 μ g). Lane F: untransduced CSOT (50 μ g). Lane G: transduced CSOT (50 μ g). Lane H: untransduced SCC (400 μ g). Lane I: transduced SCC (400 μ g). Lane J: untransduced cBMSC (400 μ g). Lane K: transduced cBMSC (400 μ g). Two bands (20 kDa and 17 kDa) are detected in transduced CMT2, CPA and cBMSC cells. Two bands (20 kDa and 16 kDa) are detected in transduced CSOT cells. A single 20 kDa band is present in transduced SCC cells.

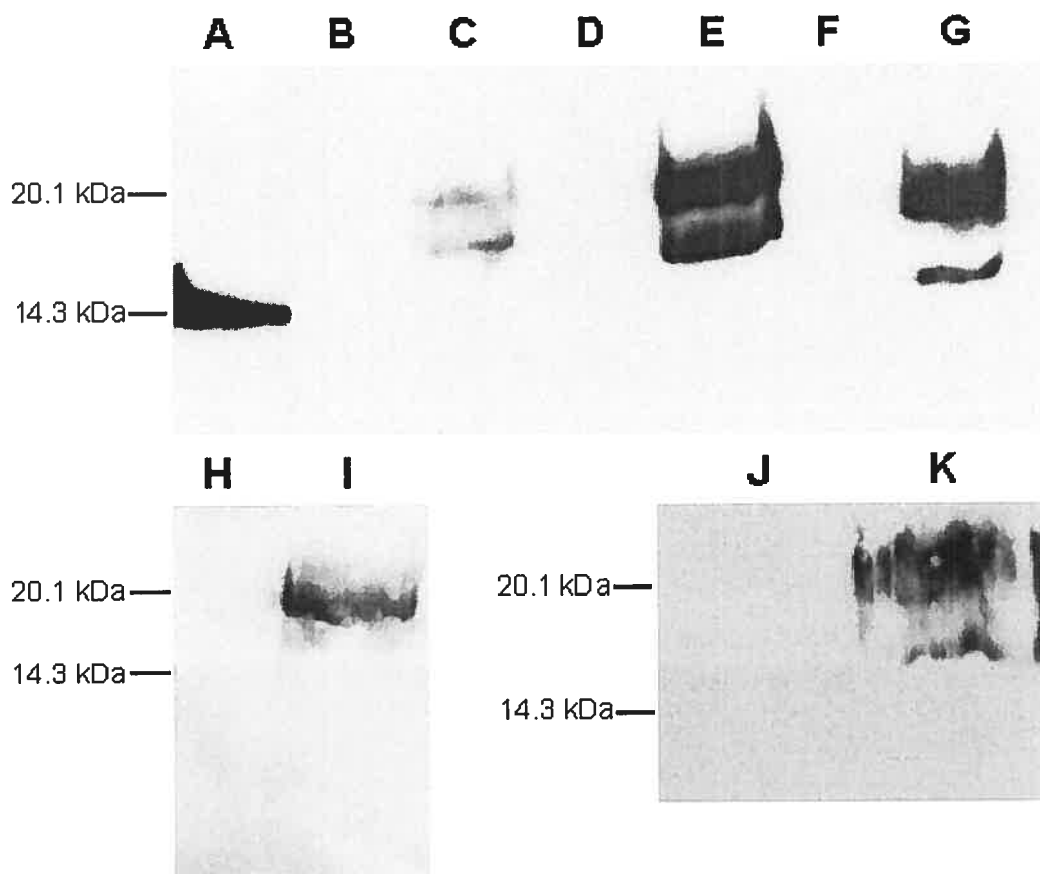
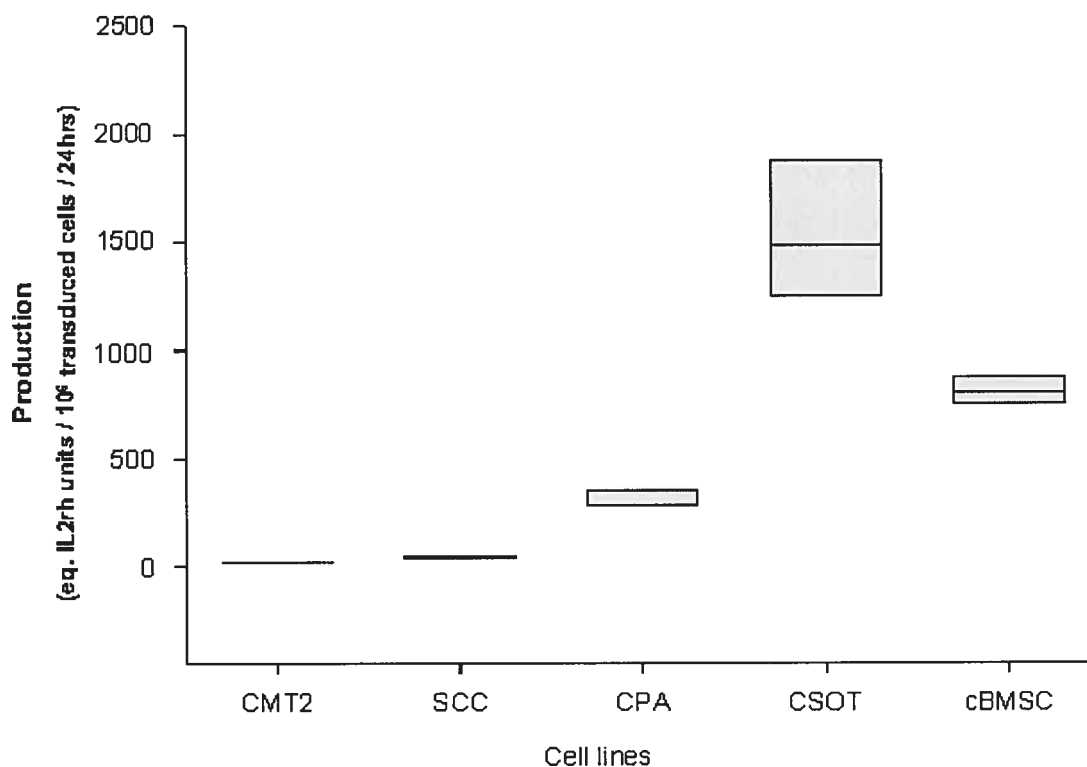


Figure 5. Functional analysis of vCanIL2-GFP transduced canine cancer cell lines supernatants and transduced cBMSCs supernatant. CTLL-2 cells were incubated with supernatant from transduced cells to measure IL-2 activity produced and released in the culture medium. Canine IL-2 is expressed in equivalent of rhIL-2 units / 10^6 transduced cells / 24 h calculated from a standard curve made with known concentrations of rhIL-2. Supernatant from untransduced cells had no detectable levels of IL-2 activity (data not shown). The horizontal lines within the boxes represent the median. Top and bottom of boxes represent the third and first quartile respectively.



DISCUSSION

L'incidence du cancer dans la population humaine ne cesse de croître. Le cancer se classe au deuxième rang des conditions pathologiques les plus meurtrières, juste derrière les maladies cardiaques. Les cancers vus le plus fréquemment chez l'homme en Amérique du Nord sont le cancer de la prostate, le cancer du poumon et cancer du colon tandis que ceux rencontrés le plus souvent chez la femme sont le cancer du sein, le cancer du poumon ainsi que le cancer du colon. Par ailleurs, le cancer du poumon demeure celui tuant le plus d'humains en Amérique du Nord, hommes et femmes confondus [sites internet de Santé Canada (statistiques de 2002) et d'American cancer society (statistiques de 2003)].

Depuis plusieurs années, les chercheurs s'affairent à trouver des thérapies efficaces contre le cancer. Les thérapies conventionnelles (chimiothérapie, radiothérapie, exérèse chirurgicale et immunothérapie) ainsi que celles plus récentes (vaccination, thérapie génique et thérapie cellulaire) sont constamment améliorées dans le but de trouver une méthode thérapeutique peu nocive pour le patient mais détruisant la majorité des cellules tumorales, c'est-à-dire les cellules constituant la masse tumorale primaire ainsi que celles constituant les métastases disséminées à travers le patient.

Le concept de l'immunothérapie du cancer a été introduit en 1893 par William Coley lorsqu'il utilisa des extraits pyogéniques de bactéries pour

induire une réponse immunitaire spontanée contre les tumeurs. Malheureusement, les essais de Coley n'ont pas produit les résultats escomptés et ont été abandonnés.

L'immunothérapie du cancer fut ensuite l'objet d'un enthousiasme renouvelé avec la découverte des antigènes associés aux tumeurs (AAT). Depuis ce temps, de nombreuses stratégies sont explorées en immunothérapie du cancer, allant des stratégies non-spécifiques (telle que l'administration de l'interleukine 2) à des stratégies beaucoup plus spécifiques (telle que la vaccination avec des AAT) (Kwak H, 2003).

De nombreuses études faites dans des modèles murins de cancer ont suggéré le potentiel thérapeutique de l'interleukine 2 (IL-2) lorsqu'elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres molécules ou procédés thérapeutiques (Brockstedt DG, 2002) (Guo SY, 2003) (Koten JW, 2003) (Kimura Y, 2003). L'IL-2 est une interleukine de 15.4 kDa impliquée dans l'immunité cellulaire cytotoxique (immunité requise pour la destruction des cellules cancéreuses). Elle possède plusieurs fonctions dont l'activation et la prolifération des lymphocytes (B et T) et des cellules NK. Elle permet aussi la différenciation de ces cellules en effecteurs de l'immunité cellulaire cytotoxique (CTL, NK et LAK) et la production d'anticorps reconnaissant les antigènes tumoraux à la surface des cellules cancéreuses (Tizard IR, 2000). L'IL-2 est une cytokine dont la production est restreinte au sous-type I des

lymphocytes auxiliaires (Th1). L'administration d'IL-2 recombinante en thérapie du cancer a donc été explorée dans des modèles murins de cancer afin de stimuler le système immunitaire à détruire les masses cancéreuses.

Des résultats encourageants obtenus dans ces modèles murins ont mené aux essais cliniques chez l'humain. Des protocoles décrivant l'administration de fortes doses systémiques d'IL-2 recombinante chez des humains atteints de carcinomes rénaux ou de mélanomes ont mené à des régressions partielles et totales des tumeurs (Rosenberg SA, 2001). Par exemple, 26.8% des 56 patients recevant une forte dose d'IL-2 humaine en infusion continue ont connu une réponse (partielle ou totale) dans une étude sur le traitement de carcinomes rénaux avec métastases (Libra M, 2003). Par contre, l'importante toxicité découlant d'une perméabilité vasculaire accrue associée à l'administration systémique de doses élevées d'IL-2 est venue assombrir cette stratégie thérapeutique.

D'autres protocoles décrivant l'administration systémique d'IL-2 à des doses moyennes ou faibles ont alors été testés chez des patients humains atteints de carcinomes rénaux ou de mélanomes (Mitchell MS, 2003). Les taux de régression des cancers, déjà faibles lorsque l'IL-2 était administrée à des doses élevées, ont diminués lors d'administration de dosages plus faibles. Cette baisse d'efficacité s'explique par le fait que l'IL-2 est une molécule agissant de façon paracrine et que les concentrations d'IL-2 obtenues dans

l'environnement des tumeurs ne sont pas suffisamment élevées lorsque l'IL-2 est administré par voie systémique à de faible ou moyenne doses (Stagg J, 2004. Communication personnelle).

Depuis ces résultats, beaucoup d'efforts ont été mis dans le développement d'une stratégie qui permettrait d'obtenir une concentration élevée d'IL-2 aux sites des tumeurs tout en minimisant sa concentration systémique, et par le fait même, ses effets toxiques. Plusieurs modèles thérapeutiques localisant l'IL-2 dans les masses tumorales ont été développés et testés dans des modèles murins de cancer (Brockstedt DG, 2002) (Guo SY, 2003) (Koten JW, 2003) (Kimura Y, 2003). Une façon de localiser l'IL-2 dans les masses tumorales consiste à transférer chez le patient le gène de l'IL-2 directement dans ses cellules tumorales ou dans les cellules intimement liées aux cellules tumorales (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules du système immunitaire, etc.) Cette approche thérapeutique est l'immunothérapie génique du cancer.

Dans cette approche, le gène de la protéine thérapeutique peut soit être injecté dans les masses tumorales sous forme d'ADN nu ou à l'intérieur de vecteurs. Des études suggèrent que l'IL-2 délivrée par des vecteurs viraux pourrait être utilisée avec succès. En effet, l'IL-2 joue un rôle important dans l'immunité cellulaire cytotoxique et les vecteurs viraux sont capables de transduire des cellules *in vivo* avec une efficacité considérée souvent

meilleure que l'efficacité obtenue avec d'autres moyens de transduction (Evans ME, 2002) (Galipeau J, 1999) (Nadeau I, 2003).

Ce projet de maîtrise visait à transduire efficacement des cellules canines à l'aide d'un vecteur viral (rétrovecteur) codant pour l'IL-2 canine, de vérifier l'expression de l'IL-2 canine par les cellules transduites ainsi que sa fonctionnalité. Les CSMOc représentent un intérêt en thérapie génique du cancer puisqu'elles sont facilement prélevées ainsi que multipliées et modifiées *in vitro*. Par ailleurs, l'adénocarcinome mammaire et le carcinome spinocellulaire sont intéressants à cause de leur incidence relativement élevée au sein de la population humaine et canine et l'adénocarcinome prostatique présente un intérêt certain en thérapie génique puisque cette tumeur est facilement accessible par injection (sites internet de Santé Canada : statistiques de 2002 & American cancer society : statistiques de 2003) (Albert MR, 2003) (Trudel S, 2003) (Weld KJ, 2002).

L'espèce canine a été choisie parce que les animaux de compagnie (chien et chat) seraient de meilleurs modèles pour comprendre la biologie des cancers, pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et pour vérifier l'efficacité et la sécurité de ces traitements avant de les utiliser en études cliniques chez l'humain.

En effet, plusieurs différences existent entre les rongeurs et les humains comme: la masse corporelle, la longévité et l'âge auquel le cancer

est présent dans l'animal (les cancers apparaissent à un âge tardif chez l'humain mais sont institués dans des modèles murins relativement jeunes). À cette liste s'ajoutent la diversité génétique de l'humain, l'environnement dans lequel les animaux de laboratoire sont gardés, la diversité du « style de vie » des humains (les rongeurs sont tous en cage tandis que le style de vie des humains diffère beaucoup si l'on compare, par exemple, les sédentaires aux gens plus actifs, les fumeurs aux non fumeurs, etc.) et la nature des tumeurs étudiées chez les rongeurs (tumeurs non spontanées) (tableau III). À toutes ces différences s'ajoute le fait que les modèles murins portent des cancers greffés à des endroits différents de ceux où apparaissent spontanément ces cancers chez l'humain (tumeurs non orthotopiques). Finalement, une considération importante est que les rongeurs sont des mammifères éloignés phylogéniquement de l'humain si on les compare aux chiens et possèdent donc des caractéristiques propres à leur espèce parfois très différentes des caractéristiques de l'humain. Parmi ces caractéristiques, leurs mécanismes de défense contre le cancer constituent une variable non négligeable.

La majorité des points discordants soulignés lorsqu'on compare les rongeurs aux humains disparaissent lorsque cette comparaison est faite entre le chien et l'humain. De plus, le cancer constitue chez le chien comme chez l'humain une cause majeure de mortalité. Ainsi, l'incidence du cancer pour 100 000 individus par an (en ajustant l'âge) est estimée à 381 pour les

chien et à 300 pour les humains aux États-Unis, taux qui sont donc comparables pour ces deux espèces (Vail DM, 2000).

Parmi les différents vecteurs viraux utilisés en recherche, les rétrovecteurs sont des véhicules très intéressants puisqu'ils permettent l'intégration stable et l'expression soutenue des gènes thérapeutiques par les cellules transduites (tableau I). Par ailleurs, des administrations successives de rétrovecteurs sont possibles puisque ces derniers sont moins immunogènes que d'autres vecteurs viraux et ne provoquent pas de réaction immunitaire indésirable menant à leur destruction avant d'avoir atteint les cellules cancéreuses. De plus, lorsqu'ils portent la protéine VSV-G à leur surface, les rétrovecteurs peuvent introduire leur matériel génétique dans un spectre plus diversifié de cellules. En effet, la protéine se lie spécifiquement à deux phospholipides contenus dans la membrane cellulaire de toutes les cellules eucaryotes, soit la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol. Suite à la liaison de la protéine VSV-G à ces phospholipides membranaires, les rétrovecteurs sont internalisés dans les cellules cibles et le matériel génétique qu'ils contiennent est inséré dans le génome des cellules. Par ailleurs, la protéine VSV-G rend les rétrovecteurs plus résistants en les protégeant d'une inactivation par le complément, en les rendant moins fragiles aux cycles de gel-dégel associés à la production et l'entreposage des rétrovecteurs ainsi que moins fragiles aux ultracentrifugations (procédé utilisé fréquemment lors de thérapie génique *in vivo*) (Galipeau J, 1999).

Les rétrovecteurs codant pour l'IL-2 canine (vCanIL2-GFP) ont été utilisés pour transduire des cellules stromales de la moelle osseuse canine saines (CSMOc) et des cellules canines tumorales (adénocarcinome mammaire, adénocarcinome de la prostate, carcinome spinocellulaire et tumeur stromale ovarienne). La susceptibilité de chacune de ces lignées cellulaires à la transduction par les rétrovecteurs a été déterminée en analysant par cytométrie de flux les différentes lignées exposées aux rétrovecteurs. Une grande variabilité a été notée quant à la susceptibilité des différents types cellulaires canins (figure 3 dans l'article).

Plusieurs points peuvent expliquer cette variabilité, en commençant par l'efficacité même des rétrovecteurs à reconnaître les différents types cellulaires (c'est-à-dire la proportion de phospholipides composant la membrane cellulaire de chacun des types cellulaires), à être internalisés par ces types cellulaires, à procéder aux transformations requises du matériel génétique qu'ils transportent dans le cytoplasme des différents types cellulaires, à diriger ces informations vers le noyau des cellules transduites et à intégrer les informations génétiques dans le génome de ces cellules. Vient ensuite l'efficacité variable du promoteur LTR à promouvoir l'expression de l'IL-2 canine et de GFP à l'intérieur de chaque type cellulaire et la capacité des différents types cellulaires à inactiver l'information génétique véhiculée par les rétrovecteurs (silencing). Finalement, mentionnons le métabolisme plus ou moins élevé propre à chaque type cellulaire ayant directement une

répercussion sur la synthèse protéique totale (incluant la synthèse d'IL-2 canine et GFP) et l'action de l'IL-2 canine sur les différents types cellulaires une fois qu'elle se retrouve en solution dans le surnageant des cellules transduites. Des études démontrent par exemple que les kératinocytes tumoraux et les tumeurs mammaires expriment les récepteurs d'IL-2 (Garcia-Tunon I, 2004) (Gröne A, 2002).

L'IL-2 canine a été détectée dans le surnageant de chacune des cinq lignées canines transduites en quantités variant d'une lignée cellulaire à l'autre (figure 4 dans l'article). En effet, la protéine IL-2 canine était en quantité plus faible dans le surnageant de l'adénocarcinome mammaire et du carcinome spinocellulaire que dans les trois autres lignées suite à leur exposition aux rétrovecteurs (vCanIL2-GFP) tel qu'il a été mesuré par analyse Western. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'adénocarcinome mammaire était la lignée tumorale la plus fortement transduite (61%), tel que mesuré par l'analyse au FACS (cytométrie de flux). Puisque la GFP et l'IL-2 canine sont sur le même ARNm, trois hypothèses peuvent alors être posées : soit que l'IL-2 canine mène à la mort des cellules lorsqu'elle se retrouve dans leur environnement, soit les cellules relâchent une grande quantité de protéines autres que l'IL-2 canine et que ces autres protéines masquent celle d'intérêt ou soit que l'information génétique transmise par les rétrovecteurs a été inactivée entre l'analyse par cytométrie de flux (détection de GFP) et l'analyse Western (détection d'IL-2). Afin de préciser cette dernière hypothèse, mentionnons qu'une période moyenne de 15 jours s'est écoulée

entre la transduction des différents types cellulaires canins et la récolte de surnageant servant aux analyses Western.

De plus, deux bandes sont détectées pour plusieurs lignées tumorales transduites (17kDa et 20kDa pour les adénocarcinomes mammaire et prostatique ainsi que 16kDa et 20kDa pour la tumeur stromale ovarienne). Ces bandes de différents poids moléculaires représentent probablement différents niveaux de glycosylation de l'IL-2 canine.

Finalement, l'activité biologique de l'IL-2 canine produite par les lignées cellulaires canines transduites fut analysée par une analyse fluorométrique mesurant l'activité métabolique d'une lignée de lymphocytes T murins dépendant de l'IL-2 (CTLL-2). Le surnageant des lignées canines transduites (contenant l'IL-2 canine) fut mis en culture pendant 44 heures avec ces CTLL-2. Suite à cette incubation, un réactif colorimétrique nommé Alamar blue fut ajouté aux CTLL-2 et un temps de réaction de 4 heures fut alloué afin de déterminer l'activité métabolique de la lignée de lymphocytes T incubée avec le surnageant des différentes lignées cellulaires transduites. Grâce à une courbe contrôle réalisée avec des concentrations connues d'IL-2rh, la quantité d'IL-2 canine fonctionnelle fut estimée pour chacun des surnageants testés. Chaque surnageant fut donc caractérisé en équivalent d'unité d'IL-2rh par million de cellules canines transduites par 24 heures (eq IL2rh / 10^6 cellules transduites / 24hrs). La quantité d'IL-2 canine

fonctionnelle produite par chacune des lignées transduites semble être proportionnelle à la quantité d'IL-2 canine détectée par analyse Western. En effet, les deux lignées produisant le moins d'IL-2 canine fonctionnelle (adénocarcinome mammaire et carcinome spinocellulaire) étaient aussi les deux lignées qui produisaient le moins d'IL-2 tel que déterminé par analyse Western alors que la lignée produisant le plus d'IL-2 canine fonctionnelle (tumeur stromale ovarienne) était la lignée la plus facilement détectable en analyse Western blot (figure 5 dans l'article).

Suite à ces analyses, nous avons conclu que le rétrovecteur vCanIL2-GFP est capable de transduire efficacement *in vitro* des cellules canines primaires normales (CSMOc) et des lignées cellulaires tumorales canines (adénocarcinome mammaire et prostatique, carcinome spinocellulaire et tumeur stromale ovarienne). De plus, suite à la transduction, les cellules canines peuvent synthétiser une protéine thérapeutique fonctionnelle (IL-2 canine) et la libérer dans l'environnement extra-cellulaire.

CONCLUSION

Le cancer représente la deuxième condition pathologique la plus meurtrière chez l'humain en partie parce que peu de stratégies conventionnelles de traitement se sont avérées efficaces à traiter universellement les cancers. Les résultats encourageants obtenus en thérapie génique dans un modèle animal beaucoup plus ressemblant à l'humain, soit le modèle canin, nous permettent d'espérer la découverte de thérapies antitumorales plus efficaces chez l'humain.

L'IL-2 a été une des premières cytokines dont l'application en immunothérapie a été étudiée puisque cette cytokine joue un rôle central dans l'immunité cellulaire cytotoxique qui est le type d'immunité en grande partie responsable de la destruction des tumeurs. En approfondissant nos connaissances sur les fonctions et les particularités de l'IL-2, nous serons de plus en plus aptes à combiner l'immunothérapie génique du cancer à d'autres thérapies géniques et/ou d'autres modalités thérapeutiques. La nouvelle notion de fonction bipolaire de l'IL-2 (activation versus apoptose des lymphocytes) qui émerge lentement nous oblige à la réflexion portant sur la nécessité d'obtenir les niveaux d'expression les plus élevés possibles au site des tumeurs (Garcia-Tunon I, 2004).

Ce projet de recherche a permis de conclure que le vecteur viral construit (rétrovecteur MoMLV pseudotypé avec VSV-G codant pour l'IL-2 canine) pouvait transduire efficacement quatre lignées cellulaires tumorales canines différentes soit un adénocarcinome mammaire, un adénocarcinome de la prostate, un carcinome spinocellulaire ainsi qu'une tumeur stromale de l'ovaire. Suite à la transduction de ces lignées tumorales canines, la protéine IL-2 canine a été retrouvée dans le surnageant de chacune d'elles lorsqu'elles étaient maintenues en culture.

Cette étude a aussi permis de conclure que chaque lignée tumorale canine produisait des quantités différentes d'IL-2 canine fonctionnelle suite à des analyses réalisées avec une lignée cellulaire de lymphocytes T murins qui dépendent de l'IL-2 pour survivre et proliférer *in vitro*. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différentes quantités d'IL-2 : des différences dans l'efficacité de transduction et l'efficacité inégale du promoteur LTR à induire l'expression du gène de l'IL-2 canine dans les différents types cellulaires transduits.

Par ailleurs, ce projet a aussi permis de conclure que le vecteur viral développé était capable de transduire des cellules stromales de la moelle osseuse canine mises en culture, que les cellules stromales transduites exprimaient l'IL-2 canine et que cette dernière était aussi fonctionnelle.

Les rétrovecteurs développés semblent donc adéquats pour être utilisés en immunothérapie génique du cancer chez le chien. Les prochaines étapes consistent à vérifier le potentiel thérapeutique de ce système *in vivo*. Pour ce faire, des lignées cellulaires cancéreuses ou des cellules fraîches de la moelle osseuse canine peuvent être transduites *in vitro* puis implantées près des masses tumorales. Pour développer une thérapie possédant un caractère le plus universel possible, deux possibilités s'offrent à nous. La première consiste à transduire *in vitro* des cellules stromales de la moelle osseuse isolées d'un chien donné et à les implanter dans les tumeurs de patients canins différents. En effet, ces cellules n'expriment pas une forte proportion de CHM I/II à leur surface et sont alors moins susceptibles à un rejet immunitaire dans le chien traité (J.Galipeau, 2004. Communication personnelle). Une autre alternative consiste à utiliser des cellules cancéreuses transduites *in vitro* puis irradiées et insérées dans une chambre isolante implantée dans le chien à traiter. Cette unité crée une barrière entre les cellules du système immunitaire du chien et les cellules modifiées employées en immunothérapie génique afin de prolonger la survie des cellules implantées et d'empêcher l'éventualité que ces cellules soient encore tumorigéniques. Rappelons toutefois que la survie prolongée des cellules modifiées ne constitue pas un paramètre essentiel à la thérapie puisque l'IL-2 n'est nécessaire que de façon transitoire pour activer les cellules du système immunitaire du patient.

Suite à ces essais thérapeutiques réalisés dans un modèle canin, et si des résultats prometteurs sont obtenus, cette stratégie d'immunothérapie génique pourra être testée chez les humains cancéreux. L'adénocarcinome mammaire représente une cible de choix puisque cette tumeur est fréquente chez la chienne et la femme et qu'elle est facilement accessible à différentes modalités thérapeutiques (Vail DM, 2000).

BIBLIOGRAPHIE

- Albert M.R., Weinstock M.A.** (2003) Keratinocyte Carcinoma. *CA Cancer J Clin* **53**: 292-302.
- Albright J.W. et al.** (2004) Aging of innate immunity : functional comparisons of NK/LAK cells obtained from bulk cultures of young and aged mouse spleen cells in high concentrations of interleukin-2. *Experimental Gerontology* **39**: 73-82.
- Ali S.A. et al.** (2000) Preclinical Evaluation of "Whole" Cell Vaccines for Prophylaxis and Therapy Using a Disabled Infectious Single Cycle-Herpes Simplex Virus Vector to Transduce Cytokine Genes. *Cancer Research* **60**: 1663-1670.
- Andrawiss M. et al.** (2001) Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *The Journal of Gene Medicine* **3**: 228-239.
- Athie-Morales V. et al.** (2004) Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol.* **172** (1): 61-69.
- Barzon L. et al.** (2003) Gene therapy of thyroid cancer via retrovirally-driven combined expression of human interleukin-2 and Herpes Simplex Virus thymidine kinase. *European Journal of Endocrinology* **148**: 73-80.
- Bathe O. et al.** (2003) Therapeutic limitations in tumor-specific CD8+ memory T cell engraftment. *BMC Cancer* **3** (21) Publié sur internet (<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/3/21>)
- Bergman P.J.** (2003) Mechanisms of anticancer drug resistance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **33** (3): 651-667.
- Brockstedt D.G. et al.** (2002) Development of Anti-tumor Immunity against a Non-immunogenic Mammary Carcinoma through *in Vivo* Somatic GM-CSF, IL-2, and HSVtk Combination Gene Therapy. *Molecular Therapy* **6**(5): 627-636.
- Brockstedt D.G. et al.** (1999) Induction of Immunity to Antigens Expressed by Recombinant Adeno-Associated Virus Depends on the Route of Administration. *Clinical Immunology* **92** (1): 67-75.

- Bubanovic I.V.** (2003) Origin of anti-tumor immunity failure in mammals and new possibility for immunotherapy. *Medical Hypothesis* **60** (2): 152-158.
- Burton E.A. et al.** (2002) Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell. Biol.* **21** (12): 915-936.
- Cabrera T. et al.** (2000) High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Human Immunol.* **61**: 499-506.
- Cabrera T. et al.** (1998) High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* **52**: 114-123.
- Cabrera T. et al.** (1996) High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human Immunol.* **50**: 127-134.
- Casana P.H. et al.** (2002) Interleukin-2 inhibits proliferation of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **299**: 818-824.
- Chada S. et al.** (2003) Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **5** (5): 463-474.
- Clark J.H. et al.** (2003) Melanoma inhibits dendritic cell induction of cell-mediated immunity. *J. Surg. Res.* **114** (2): 300.
- Cui Z., Willingham M.C.** (2004) The effect of aging on cellular immunity against cancer in SR/CR mice. *Cancer Immunology Immunotherapy* Publié sur internet (site Springer-Verlag 10.1007/s00262-003-0488-2)
- Daga A. et al.** (2002) Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. *Gene Therapy* **9**: 915-921.
- De Palma M. et al.** (2003) In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **14** (12): 1193-1206.

- De Visser K.E. et al.** (2003) CD8+T Cell Tolerance and Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunotherapy* **26** (1): 1-11.
- Dobrovina E.S. et al.** (2003) Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *The Journal of Immunology* **171**: 6891-6899.
- Dow S.W. et al.** (1998) In Vivo Tumor Transfection with Superantigen plus Cytokine Genes Induces Tumor Regression and Prolongs Survival in Dogs with Malignant Melanoma. *J. Clin. Invest.* **101** (11): 2406-2414.
- Dranoff G. et al.** (2003) GM-CSF-secreting melanoma vaccines. *Oncogene* **22** (20): 3188-3192.
- El-Aneed A.** (2004) An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* **94**: 1-14.
- Engels B. et al.** (2003) Retroviral Vectors for High-Level Transgene Expression in T Lymphocytes. *Human Gene Therapy* **14**: 1155-1168.
- Evans M.E. et al.** (2002) Infection Control for Gene Therapy : A Busy Physician's Primer. *Clinical Infectious Diseases* **35**: 597-605.
- Fehniger T.A. et al.** (2002) Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **13**: 169-183.
- Felsburg P.J.** (2002) Overview of immune system development in the dogs: comparison with humans. *Human & Experimental Toxicology* **21**: 487-492.
- Friedmann T.** (2003) Gene Therapy's New Era: A Balance of Unequivocal Benefit and Unequivocal Harm. *Molecular Therapy* **8** (1): 5-7.
- Galipeau J. et al.** (1999) Vesicular Stomatitis Virus G Pseudotyped Retrovector Mediates Effective *in Vivo* Suicide Gene Delivery in Experimental Brain Cancer. *Cancer Research* **15** (59): 2384-2394.

- Garcia-Lora A. et al.** (2003) MHC Class I Antigens, Immune Surveillance, and Tumor Immune Escape. *Journal of Cellular Physiology* **195**: 346-355.
- Garcia-Tunon I. et al.** (2004) Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in *in situ* and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer* **6**: R1-R7. (DOI 10.1186/bcr730)
- Georgiannos S.N. et al.** (2003) The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery* **134**: 827-834.
- Gray D.W.R.** (2001) An Overview of the Immune System with Specific Reference to Membrane Encapsulation and Islet Transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **944**: 226-239.
- Gröne A.** (2002) Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **88**: 1-12.
- Gunji Y. et al.** (2000) Gene Therapy for Cancer. *Surgery Today* **30**: 967-973.
- Guo S.Y. et al.** (2003) TK gene combined with mIL-2 and mGM-CSF genes in treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* **9** (2): 233-237.
- Habib T.H.** (2003) IL-21: A novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *J Allergy Clin Immunol* **112**: 1033-1045.
- Hacein-Bey-Abina S. et al.** (2003) LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **17** (302): 415-419.
- Hanahan D, Weinberg R.A.** (2000) The Hallmark of Cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hill H.C. et al.** (2002) Cancer Immunotherapy with Interleukin 12 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor-encapsulated Microspheres: Coinduction of Innate and Adaptive Antitumor Immunity and Cure of Disseminated Disease. *Cancer Research* **62**: 7254-7263.

- Huland E. et al.** (2003) Renal cell carcinoma: novel treatments for advanced disease. *Curr Opin Urol* **13** (6): 451-456.
- Ishii K. et al.** (2002) Structural Analysis of Vaccinia Virus DIs Strain: Application as a New Replication-Deficient Viral Vector. *Virology* **302**: 433-444.
- Jackaman C. et al.** (2003) IL-2 Intratumoral Immunotherapy Enhances CD8+ T Cells That Mediate Destruction of Tumor Cells and Tumor-Associated Vasculature: A Novel Mecanism for IL-2. *The Journal of Immunology* **171**: 5051-5063.
- Jantscheff P. et al.** (1999) Cancer gene and immunotherapy: recent developments. *Medical Oncology* **16**: 78-85.
- Ji J. et al.** (2002) Glycoinositol Phospholipid-anchored Interleukin 2 but not Secreted Interleukin 2 Inhibits Melanoma Tumor Growth in Mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. **1**: 1019-1024.
- Kaufman H.L. et al.** (2003) The role of poxviruses in tumor immunotherapy. *Surgery* **134** (5): 731-737.
- Kay M.A. et al.** (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicules of therapeutics. *Nature Medicine* **7** (1): 33-40.
- Khanna C. et al.** (1997) Interleukin-2 Liposome Inhalation Therapy Is Safe and Effective for Dogs with Spontaneous Pulmonary Metastases. *Cancer* **79**: 1409-1421.
- Khorana A.A. et al.** (2003) A phase I trial of immunotherapy with intratumoral adenovirus-interferon-gamma (TG1041) in patients with malignant melanoma. *Cancer Gene Ther.* **10** (4): 251-259.
- Kichina J.V. et al.** (2003) Melanoma cells can tolerate high levels of transcriptionally active endogenous p53 but are sensitive to retrovirus-transduced p53. *Oncogenes* **22**: 4911-4917.
- Kimmick G. et al.** (2004) Subcutaneously Administered Recombinant Human Interleukin-2 and Interferon Alfa-2a for Advanced Breast Cancer: A Phase II study of the Cancer and Leukemia Group (CALGB 9041). *Invest New Drugs* **22** (1): 83-89.

- Kimura Y. et al.** (2003) Effects of combined therapy with interleukin 2 and interleukin 12 gene-transfected tumor vaccine for head and neck carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **129** (11): 1181-1185.
- Kircheis R. et al.** (1999) Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J. Gene Med.* **1**: 111-120.
- Knapp D.W. et al.** (1997) Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Molecular Medicine Today* **3** (1): 8-11.
- Koopman L.A. et al.** (2000) Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leucocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J. Exp. Med.* **20**: 961-976
- Koten J.W. et al.** (2003) IL-2 loaded dextran microspheres with attractive histocompatibility properties for local IL-2 cancer therapy. *Cytokine* **24** (3): 57-66.
- Kruth S.A.** (1998) Biological response modifiers: interferons, interleukins, recombinant products, liposomal products. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **28** (2): 269-295.
- Kwak H. et al.** (2003) Poxviruses as vectors for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **6** (2): 161-168.
- Laiho M., Latonen L.** (2003) Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Ann Med* **35**: 391-397.
- Latchman D.S.** (2002) Herpes simplex virus vectors for gene delivery to a variety of different cell types. *Curr. Gene Ther.* **2** (4): 415-426.
- Leoni L., Desai T.A.** (2004) Micromachined biocapsules for cell-based sensing and delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**: 211-229.
- Libra M. et al.** (2003) Long-term survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with continuous intravenous infusion of recombinant interleukin-2: the experience of a single institution. *Tumori.* **89** (4): 400-404.

- Licht T. et al.** (2002) Drug selection with paclitaxel restores expression of linked IL-2 receptor γ -chain multidrug resistance (*MDR1*) transgenes in canine bone marrow. *PNAS* **99** (5): 3123-3128.
- Lichter T., Glick R.P.** (2003) Cytokine immuno-gene therapy for treatment of brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* **65**: 247-259.
- Lundqvist A. et al.** (2002) Gene-Modified Dendritic Cells for Immunotherapy Against Cancer. *Medical Oncology* **19** (4): 197-211.
- Luo Y. et al.** (2003) Plasmid DNA encoding human carcinoembryonic antigen (CEA) adsorbed onto cationic microparticules induces protective immunity against colon cancer in CEA-transgenic mice. *Vaccine* **21**: 1938-1947.
- Mayr B. et al.** (2003) *N-ras* Mutations in Canine Malignant Melanomas. *The Veterinary Journal* **165**: 169-171.
- Misumi M. et al.** (2003) In vitro thymidine kinase/ganciclovir-based suicide gene therapy using replication defective herpes simplex virus-1 against leukemic B-cell malignancies (MCL, HCL, B-CLL). *Leukemia Research* **27**: 695-699.
- Mitchell M.S. et al.** (2003) Combinations of anticancer drugs and immunotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy* **52** (11): 686-692.
- Mohammed S.I. et al.** (2001) Prostaglandin E₂ concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **64** (1): 1-4.
- Nadeau I., Kamen A.** (2003) Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances* **20**: 475-489.
- Ochsenbein A.F.** (2002) Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Therapy* **9**: 1043-1055.
- Oertli D. et al.** (2002) Rapid Induction of Specific Cytotoxic T Lymphocytes Against Melanoma-Associated Antigens by a Recombinant Vaccinia Virus Vector Expressing

Multiple Immunodominant Epitopes and Costimulatory Molecules *In Vivo*. *Human Gene Therapy* **13**: 569-575.

Oh S. et al. (2003) Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *PNAS* **100** (6): 3392-3397.

Palmer D. et al. (2003) Improved System for Helper-Dependent Adenoviral Vector Production. *Molecular Therapy* **8** (5): 846-852.

Palù G. et al. (1999) Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans. *Gene Therapy* **6**: 330-337.

Parkinson C. et al. (1993) The Use of the Dog in Toxicity Tests on Pharmaceutical Compounds. *Human & Experimental Toxicology* **12**: 99-109.

Parkinson R.J. et al. (2003) Disabled Infectious Single Cycle Herpes Simplex Virus (DISC-HSV) Is a Candidate Vector System for Gene Delivery/Expression of GM-CSF in Human Prostate Cancer Therapy. *The Prostate* **56**: 65-73.

Pawelec G. (2003) Tumor escape: antitumor effectors too much of a good thing? *Cancer Immunology Immunotherapy*. Publié sur internet (site Springer-Verlag 2003 10.1007/s00262-003-0469-5)

Pirie-Shepherd S.R. et al. (2002) The Role of Angiostatin in the Spontaneous Bone and Prostate Cancers of Pet Dogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**: 886-891.

Polsky D., Cordon-Cardo C. (2003) Oncogenes in melanoma. *Oncogene* **22**: 3087-3091.

Powell S.K. et al. (1999) In Vitro Analysis of Transformation Potential Associated with Retroviral Vector Insertions. *Human Gene Therapy* **1** (10): 2123-2132.

Quintin-Colonna F. et al. (1996) Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Therapy* **3** (12): 1104-1112.

- Ramachandran C. et al.** (2003) Effect of MDR1 phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in multidrug-resistant human tumor lines and xenografts. *Anticancer Res.* **23** (3B): 2681-2690.
- Raper S.E. et al.** (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism* **80**: 148-158.
- Renkvist N. et al.** (2001) A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* **50**: 3-15.
- Ribas A. et al.** (2000) Genetic Immunotherapy for Cancer. *The Oncologist* **5**: 87-98.
- Rooney C.M. et al.** (2002) Immunotherapy for Hodgkin's disease. *Ann. Hematol.* **81** Suppl 2: S39-S42.
- Rosenberg S.A. et al.** (2001) Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Journal of Internal Medicine* **250**: 462-475.
- Safwat A. et al.** (2003) Low-dose total body irradiation augments the therapeutic effect of interleukin-2 in a mouse model for metastatic malignant melanoma. *J Exp Ther Oncol.* **3** (4): 161-168.
- Sano J. et al.** (2003) Canine *Bcl-xL* Gene and Its Expression in Tumor Cell Lines. *J. Vet. Med. Sci.* **65** (1): 149-151.
- Satoh Y. et al.** (2002) Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver of mice. *J Exp Ther Oncol.* **2** (6): 337-349.
- Schmidt W. et al.** (1995) Cancer vaccines: The interleukin 2 dosage effect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4711-4714.
- Schmitz G. et al.** (2003) Induction of Apoptosis by Canine Natural Killer Cells. *J. Vet. Med.* **50**: 156-159.

- Schneider B.L. et al.** (2003) Prevention of the Initial Host Immuno-Inflammatory Response Determines the Long-Term Survival of Encapsulated Myoblasts Genetically Engineered for Erythropoietin Delivery. *Molecular Therapy* **7** (4): 506-514.
- Sharma R. et al.** (2005) Management of chemotherapy-induced nausea, vomiting, oral mucositis, and diarrhoea. *The Lancet Oncology* **6**: 93-102.
- Shi F. et al.** (2002) Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Mol. Cancer Ther.* **1** (11): 949-957.
- Skubitz K.M. et al.** (2000) Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: a phase I clinical trial. *Anticancer Drugs* **11** (7): 555-563.
- Smith C.L. et al.** (2002) Immunotherapy of colorectal cancer. *British Medical Bulletin* **64**: 181-200.
- Smyth M.J. et al.** (2002) NKT cells-conductors of tumor immunity? *Current Opinion in Immunology* **14**: 165-171.
- Stewart A.K. et al.** (1999) Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Therapy* **6**: 350-363.
- Stewart A.K. et al.** (1998) In vivo Adenoviral-Mediated Gene Transfer of Interleukin-2 in Cutaneous Plasmacytoma. *Blood* **91** (3): 1095-1097.
- St-George J.A.** (2003) Gene therapy progress and prospect: adenoviral vectors. *Gene Therapy* **10**: 1135-1141.
- Tartour E. et al.** (2000) Phase I clinical trial with IL-2-transfected xenogeneic cells administered in subcutaneous metastatic tumours : clinical and immunological findings. *British Journal of Cancer* **83**: 1454-1461.
- Thamm D.H. et al.** (2003) Intralesional lipid-complexed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors. *Cancer Immunology Immunotherapy* **52** (8): 473-480.

- Thomas C.E. et al.** (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature* **4**: 346-358.
- Thompson J.A. et al.** (2003) A Phase I Trial of CD3/CD28-activated T Cells (Xcellerated T Cells) and Interleukin-2 in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **9**: 3562-3570.
- Timar J. et al.** (2003) The Effect of Leucocyte Interleukin Injection (Multikine®) Treatment on the Peritumoral and Intratumoral Subpopulation of Mononuclear Cells and on Tumor Epithelia: A Possible New Approach to Augmenting Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy in Oral Cancer- A Multicenter Phase I/II Clinical Trial. *Laryngoscope* **113**: 2206-2217.
- Tizard I.R. et al.** (2000) *Veterinary Immunology. An Introduction*. 6th ed. Saunders
- Trevor K.T. et al.** (2001) Transduction of human dendritic cells with a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding MUC1 and IL-2. *Cancer Immunology Immunotherapy* **50**: 397-407.
- Trudel S. et al.** (2003) A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AdIL-2) in high-risk localized prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* **10** (10): 755-763.
- Vail D.M. et al.** (2000) Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Investigation* **18** (8): 781-792.
- Volpert O.V., Alani R.M.** (2003) Wiring the angiogenic switch: Ras, Myc, and Thrombospondin-1. *Cancer Cell.* **3** (3): 199-200.
- Waldmann T.A.** (2003) IL-15 in the life and death of lymphocytes: immunotherapeutic implication. *TRENDS in Molecular Medicine* **9** (12): 517-521.
- Wang H. et al.** (2004) Ovarian carcinoma cells inhibit T cell proliferation: suppression of IL-2 receptor β and γ expression and their JAK-STAT signaling pathway. *Life Sciences* **74**: 1739-1749.

- Wang H. et al.** (2001) Antisens anticancer oligonucleotide therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* **1** (3): 177-196.
- Wang J.H. et al.** (2003) Targeting Strategies in Cancer Gene Therapy. *ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA* **35** (4): 311-316.
- Weinstein I.B.** (2002) Addiction to Oncogenes- the Achilles Heal of Cancer. *Science* **297**: 63-64.
- Weld K.J. et al.** (2002) Transrectal gene therapy of the prostate in the canine model. *Cancer Gene Therapy* **9**: 186-196.
- Whiteside T.L.** (2003) Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* **111**: S677-686.
- Whitley E.M. et al.** (2002) Canine Mammary Tumor Cells Transfected with B7-1 or B7-2 Stimulate Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Anticancer Research* **22**: 2567-2574.
- Wildiers H. et al.** (2003) Pharmacology of Anticancer Drugs in the Elderly Population. *Clin. Pharmacokinet.* **42** (14): 1213-1242.
- Williams D.A. et al.** (2003) Gene Therapy- New Challenge Ahead. *Science* **302**: 400-401.
- Yang J.C. et al.** (2003) Randomized Study of High-Dose and Low-Dose Interleukin-2 in Patients With Metastatic Renal Cancer. *J Clin Oncol* **21**: 3127-3132.
- Yazawa K. et al.** (2002) Current Progress in Suicide Gene Therapy for Cancer. *World Journal of Surgery* **26**: 783-789.
- Yazawa M. et al.** (2003) Effect of adenoviral vector that expresses the canine *p53* gene on cell growth of canine osteosarcoma and mammary adenocarcinoma cell lines. *AJVR* **64** (7): 880-888.
- Zi-Lai Z. et al.** (2003) Current Strategies and Future Directions of Antiangiogenic Tumor Therapy. *ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA* **35** (10): 873-880.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Bianca Morel		Mode de permis [Redacted]
Siège du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Bianca Morel, Hélène Boucher, Simon Authier, Guy Beauchamp, Jacques Galipeau, Daniel Martineau	
Titre Efficient oncovector-mediated transduction of canine cells with IL-2	
Revue Veterinary Immunology and Immunopathology	Date de publication Indéterminée (article en rédaction)

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Bianca Morel inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Thérapie génique de cancers spontanés chez le chien. IL-2 canine délivrée par des rétrovecteurs ».</i>			
Coauteur Simon Authier		Date 25-04-2004	
Coauteur Hélène Boucher		31-05-2005	
Coauteur Daniel Martineau		15-avr-05	
Coauteur Guy Beauchamp		31-03-2005	
Coauteur Jacques Galipeau		Avril, 05	
Coauteur			
Coauteur			
Coauteur			

Levée ENSE

Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

