VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2013 - Thèse n°

FONCTIONNALITE, SECURITE ET IMMUNOGENICITE DE TROIS NOUVEAUX VACCINS ENCODANT LA TERT CANINE, FELINE OU HYBRIDE DESTINES A UN FUTUR USAGE THERAPEUTIQUE CONTRE LES CANCERS DU CHIEN ET DU CHAT

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 2 juillet 2013
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Gabriel CHAMEL
Né (e) le 21 décembre 1988
à *Chamonix Mont-Blanc*

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2013 - Thèse n°

FONCTIONNALITE, SECURITE ET IMMUNOGENICITE DE TROIS NOUVEAUX VACCINS ENCODANT LA TERT CANINE, FELINE OU HYBRIDE DESTINES A UN FUTUR USAGE THERAPEUTIQUE CONTRE LES CANCERS DU CHIEN ET DU CHAT

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 2 juillet 2013
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Gabriel CHAMEL
Né (e) le 21 décembre 1988
à *Chamonix Mont-Blanc*

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

Départements et corps enseignant du campus vétérinaire devLyon de VETAGRO SUP

Civilité	Nom	Prénom	Unités pédagogiques	Grade
M.	ALOGNINOUWA	Théodore	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Professeur
M.	ALVESDEOLIVEIRA	Laurent	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	ARTOIS	Marc	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BARTHELEMY	Anthony	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contr actuel
Mme	BECKER	Claire	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	BELLI	Patrick	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clini que des animaux de compagnie	Maître de conférences Contr actuel
Mme	BELLUCO	Sara	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clini que des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	BENAMOUSMITH	Agnès	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BONNETGARIN	Jeanne-Marie	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
Mme	BOULOCHER	Caroline	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	BOURDOISEAU	Gilles	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	BRUYERE	Pierre	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de l a reproduction	Maître de conférences Contr actuel
M.	BUFF	Samuel	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de l a reproduction	Maître de conférences
M.	BURONFOSSE	Thierry	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	CACHON	Thibaut	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contr actuel
M.	CADORE	Jean-Luc	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CALLAITCARDINAL	Marie-Pierre	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	CAROZZO	Claude	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	CHABANNE	Luc	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Professeur
Mme	CHALVETMONFRAY	Karine	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	COMMUN	Loïc	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences Stagi aire
Mme	DELIGNETTEMULLER	Marie-Laure	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	DEMONT	Pierre	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	DESJARDINS PESSON	Isabelle	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences Contr actuel
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	ESCRIOU	Catherine	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	FAU	Didier	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	FOURNEL	Corinne	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clini que des animaux de compagnie	Professeur
M.	FRANCK	Michel	Unité pédagogique Gestion des élevages	Professeur
M.	FREYBURGER	Ludovic	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
M.	GENEVOIS	Jean-Pierre	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	GILOTFROMONT	Emmanuelle	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	GRAIN	Françoise	Unité pédagogique Gestion des élevages	Professeur
M.	GRANCHER	Denis	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
M.	GUERIN	Pierre	Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de l a reproduction	Professeur
Mme	GUERINFAUBLEE	Véronique	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
M.	JUNOT	Stéphane	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
M.	KECK	Gérard	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences Stagiaire
M.	LACHERETZ	Antoine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LAMBERT	Véronique	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Unité pédagogique Pathologie du bétail	Maître de conférences
Mme	LEBLOND	Agnès	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
Mme	LEFRANCPOHL	Anne-Cécile	Unité pédagogique Equine	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Unité pédagogique Equine	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	MARCHAL	Thierry	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Professeur
Mme	MIALET	Sylvie	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
Mme	MICHAUD	Audrey	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences Stagiaire
M.	MOUNIER	Luc	Unité pédagogique Gestion des élevages	Maître de conférences
M.	PEPIN	Michel	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur
M.	PIN	Didier	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PONCE	Frédérique	Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie	Maître de conférences
Mme	PORTIER	Karine	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	POUZOTNEVORET	Céline	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Stagiaire
Mme	PROUILLAC	Caroline	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
Mme	REMY	Denise	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	ROGER	Thierry	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
M.	SABATIER	Philippe	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences
Mme	SEGARD	Emilie	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
Mme	SERGENTET	Delphine	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Maître de conférences
Mme	SONET	Juliette	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Maître de conférences Contractuel
M.	THIEBAULT	Jean-Jacques	Unité pédagogique Biologie fonctionnelle	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI)	Professeur
Mme	VIRIEUXWATRELOT	Dorothée	Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie	Maître de conférences Contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire	Professeur

Remerciements

A Monsieur le Professeur Frédéric BERARD

De la faculté de médecine de Lyon,

Pour nous faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Hommages respectueux

A Monsieur le Docteur Ludovic FREYBURGER

Du campus vétérinaire de Lyon de VETAGRO SUP,

Pour avoir encadré ce travail avec rigueur et disponibilité. Pour tous vos conseils avisés qui m'ont été précieux à la fois pour cette thèse mais également pour l'élaboration de mon projet professionnel.

Sincères remerciements

A Madame le Docteur Frédérique PONCE

Du campus vétérinaire de Lyon de VETAGRO SUP,

Pour avoir accepté de juger ce travail. Pour m'avoir ouvert les yeux sur le monde passionnant de la cancérologie vétérinaire. Pour votre gentillesse, votre enthousiasme et vos conseils dont j'espère pouvoir profiter encore quelques années.

Avec toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Sommaire

Remerciements 5

Sommaire 7

Table des illustrations 10

Table des tableaux 12

Table des abréviations 13

Introduction – Les cancers du chien et du chat 17

Partie 1 : Etude Bibliographique 23

I. Relations entre cancer et système immunitaire 23

a. Immunité anti-tumorale et immunosurveillance 24

b. Immunité et réaction inflammatoire pro-carcinogène 27

II. Immunothérapies anticancéreuses 32

a. Principe général des immunothérapies anticancéreuses. 32

i. Les immunomodulateurs 32

ii. Les immunothérapies spécifiques de cible 34

b. Les immunothérapies chez les carnivores domestiques 39

i. Les immunomodulateurs utilisés chez les carnivores domestiques 39

ii. Les immunothérapies spécifiques de cible chez les carnivores domestiques. 42

III. La Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) 45

a. Structure et fonction de la télomérase 46

b. La télomérase est impliqué dans la genèse et l'entretien de plusieurs tumeurs chez l'homme et l'animal 49

c. Thérapies anti-télomérase 52

i. Inhibiteurs de télomérase 52

ii. Virothérapies spécifique de la TERT 53

iii. Immunothérapies anti-TERT 54
IV. Les vaccins ADN 59
a. Fonctionnement et propriétés immunologiques des vaccins ADN 59
b. Amélioration du potentiel des vaccins ADN 64
c. Avantages et inconvénients des vaccins ADN 67
i. Caractéristiques biologiques 67
ii. Caractéristiques technologiques 69
d. Plasmides ADN disponibles en santé animale 72
V. Conclusion partielle 75
Partie 2: Etude Expérimentale 79
I. Matériel, méthodes et animaux 79
a. Souris 79
b. Plasmides 79
c. Peptides utilisés pour les études en modèle murin 81
d. Peptides de la TERT canine 82
e. Produits sanguins canins 84
f. Cultures cellulaires 84
g. Transfection cellulaire 84
h. Western blots 85
i. Immunofluorescence et microscopie 85
j. Trap-assay 86
k. Immunisation et électroporation in-vivo de souris Balb/c ou C57-BL/6 89
l. Tests ELISPOT 89
m. Tests de cytotoxicité in-vivo 90
n. Immunisation *in-vitro* de PBMCs canins 91
o. Analyses statistiques des données 92

II. Résultats 93

a. Les trois plasmides sont fonctionnels in-vitro 93

b. Les trois constructions ADN encodant les TERT animales sont à l'origine d'enzymes non fonctionnelles et absentes des nucléoles 95

c. Les plasmides pDUV5, pCDT et pUF2 induisent une forte réponse immune cellulaire cytotoxique après immunisation et électroporation chez la souris. 98

d. Un répertoire de lymphocytes T spécifiques de la TERT canine existe chez le chien sain 105

III. Discussion 111

Conclusion 115

Bibliographie 117

Table des illustrations

Figure 1 : Lymphocytes infiltrant des tumeurs mammaires canines 23
Figure 2 : Mise en place de la réponse T cytotoxique anti-tumorale 26
Figure 3: Evolution des relations tumeur - système immunitaire 30
Figure 4 : Modes d'action du Rituximab 35
Figure 5 : Courbes de survie de Kaplan-Meier concernant des patients atteints de tumeur prostatique résistante à la castration traités avec l'immunothérapie Sipuleucel T ou un placebo 38
Figure 6: Survie de chiens atteints d'hémangiosarcome splénique traités avec l'immuno-modulateur L-MTP-PE ou un placebo 41
Figure 7: Courbes de survie de Kaplan-Meier chez des chiens atteints de mélanome de la cavité orale traité avec le vaccin ADN Oncept® ou avec un placebo 44
Figure 8 : Modèle d'extension progressive de l'ADN par la télomérase 47
Figure 9: Efficacité d'un protocole vaccinal ciblant la télomérase chez le chien 57
Figure 10 : Modèle de fonctionnement d'un vaccin ADN utilisé par voie intramusculaire 60
Figure 11 : Modèle de fonctionnement de l'électroporation 66
Figure 12: Représentation schématique des plasmides utilisés dans l'étude : 80
Figure 13 : Pools de peptides issus de la TERT canine 83
Figure 14 : Principe de l'ELISA TRAP-assay 88
Figure 15 : pDUV5, pCDT et pUF2 encodent une protéine TERT détectée par Western-Blot après transfection in-vitro 94
Figure 16 : Les protéines TERT modifiées sont exclues des nucléoles 96
Figure 17 : Les protéines encodées par les plasmides ne présentent pas d'activité télomérase 97
Figure 18 : L'immunisation avec pDUV5 entraine une réponse cellulaire CD8 dirigée contre des peptides retreints H2-D^b de la TERT canine chez la souris 99
Figure 19 : L'immunisation avec pUF2 entraine une réponse cellulaire CD8 et CD4 dirigée contre des peptides retreints H2-D^b ou H2-Ia^d de la TERT féline chez la souris 100
Figure 20 : L'immunisation avec pCDT entraine une réponse cellulaire CD8 et CD4 dirigée contre des peptides retreints H2-D^b ou H2-Ia^d de la TERT féline chez la souris 102
Figure 21 : L'immunisation avec pDUV5, pCDT ou pUF2 entraine une cytolyse spécifique in-vivo dirigée contre des cibles chargées avec des peptides de la TERT 104
Figure 22 : Principe de l'immunisation in-vitro 107

Figure 23 : Un répertoire de lymphocytes T spécifiques de la TERT canine, sécréteurs d'IFN-γ existe chez le chien sain..... 109
Figure 24 : Protocole de vaccination de chiens d'expérimentation 112

Table des tableaux

Tableau 1: Activité télomérase de divers échantillons de tumeurs canines 50
Tableau 2: Principaux attributs des vaccins ADN 71
Tableau 3: Plasmides mis sur le marché pour une utilisation chez l'animal 74
Tableau 4 : Séquences des peptides restreints H2 déterminées *in silico* 81

Table des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ALT : Alternative lengthening of telomeres

CCR : « C-C » chemokine receptor

CD : Cluster of Differenciation

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

COP : Cyclophosphamide Oncovin® (Vincristine) Prednisone

CPA : Cellule présentatrices d'antigènes

CRFK : Crandell-Rees Feline Kidney

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4

DC : Dendritic cell

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

ELISPOT : Enzyme linked immunospot

FDA : Food and drug administration

FLT3-L : FMS (macrophage colony stimulating factor receptor) related tyrosine kinase 3 ligand

GH : Growth hormone

GHRH : GH realising hormone

GMCSF : Granulocyte macrophage colony stomulating factor

HER2: Human epithelial growth factor receptor 2

HEK 293 T : Human embryonic kidney tumor n°293

HLA : Human leucocyte antigen

HRP : Horse Radish Peroxydase

ID/IM : Intradermique/Intramusculaire

IDO : Indoleamine 2,3 dioxygenase

IFD : Insertions in fingers domain

IFN : Interferon

IL : Interleukine

IL-4i1 : Interleukin 4 induced protein 1

iNOS : Inducible NO-synthase

KIR/KAR : Killing inhibitory receptor / Killing activatory receptor

Km : Constante de Michaëlis

LMP : Latent membrane protein

L-MTP-PE : Liposome encapsulatide muramyl tripeptide phophatidylethanolamine

MMP : Matrix metalloproteinase

NK : Natural killer

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PGLA : Polyglactic co-glycolic acid

PD-1 : Programmed cell death protein 1

RAG : Recombination activating gene

SVF : Sérum de veau fœtal

TAP : Transporter associated with antigen processing

TERT : Telomerase reverse transcriptase

TIL : Tumor infiltrating lymphocyte

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TR : Telomerase RNA

TRAP : Telomere repeat amplification protocol

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction – Les cancers du chien et du chat

A l'instar de leurs propriétaires, les 7,59 millions de chiens et les 10,96 millions de chats vivants en France (enquête FACCO/TNS SOFRES de 2010 (FACCO 2012)) ont vu leur espérance de vie augmenter progressivement. Par conséquent, comme pour la population humaine, l'augmentation de la durée de vie des carnivores domestiques s'accompagne d'une augmentation du nombre de cancers.

Dans la population canine, le taux d'incidence des cancers est compris dans une fourchette de 282,2 à 958 cas pour 100 000 chiens par an (Merlo, Rossi et al. 2008; Vascellari, Baioni et al. 2009), les variations étant dépendantes de la méthodologie utilisée lors des études. Les trois tumeurs les plus fréquentes dans l'espèce canine sont les tumeurs mammaires chez la chienne (70,5% de l'ensemble des cancers), les lymphomes non-Hodgkiniens (8,4% chez la femelle et 20,1% chez le mâle) et les tumeurs cutanées (4% chez la femelle et 19,9% chez le mâle). De plus, la société européenne d'oncologie vétérinaire estime que 50% des chiens de plus de dix ans mourront d'un trouble lié à une maladie cancéreuse (**Oncology** 2012).

Dans la population féline, le taux d'incidence est plus faible et estimé à 77 cas pour 100 000 chats. Les lymphomes et les tumeurs cutanées et sous-cutanées, avec notamment le complexe fibrosarcome félin, sont les tumeurs les plus fréquemment rencontrées en oncologie féline (Vascellari, Baioni et al. 2009)

Comparativement à ce qui existe en médecine humaine, les possibilités de traitements des cancers du chien et du chat sont assez réduites. D'autre part, en médecine vétérinaire, la mise en place d'un traitement dépend fortement du propriétaire de l'animal malade. Il est important de prendre en considération ses moyens financiers, sa motivation et son expérience personnelle afin de lui proposer la meilleure prise en charge possible pour son compagnon (**Morrison** 2002).

Aujourd'hui encore, la chirurgie reste le traitement de choix pour de nombreuses tumeurs. Cette méthode présente l'avantage d'être accessible à de nombreux praticiens et par conséquent à de nombreux animaux. De plus, dans un certain nombre de cas, lorsque la tumeur est bien localisée et accessible, la chirurgie peut être curative. Cependant pour être efficace, elle doit être large, et il arrive fréquemment que la tumeur soit trop grande, trop disséminée ou simplement inaccessible pour être retirée entièrement. Pourtant, dans ces derniers cas, la chirurgie peut être envisagée comme une solution palliative afin d'améliorer le confort de l'animal et même d'améliorer sa durée de vie : une étude effectuée sur 36 chiens atteints d'ostéosarcome a mis en évidence une augmentation de la durée de vie après résection de métastases pulmonaires (O'Brien, Straw et al. 1993).

La radiothérapie est une option thérapeutique qui prend de plus en plus d'importance en cancérologie vétérinaire. Son principal intérêt réside dans sa capacité à atteindre des tumeurs dont l'accès chirurgical est délicat, du fait de leur taille ou leur localisation, comme les tumeurs de la cavité nasale (Burk 1996) ou les tumeurs cérébrales (de Fornel, Delisle et al. 2007). De plus, la radiothérapie peut être utilisée en complément d'une autre modalité de traitement. Par exemple la radiothérapie cytoréductrice préopératoire permet de réduire la masse tumorale et de faciliter l'exérèse chirurgicale. Cependant, certains types tumoraux comme les sarcomes de la cavité buccale, sont peu sensibles à la radiothérapie (**Withrow SJ** 2007) et le coût ainsi que la faible fréquence de structures équipées rendent cette thérapie difficile d'accès.

La chimiothérapie, quant à elle, est de plus en plus étudiée et utilisée en médecine vétérinaire. Profitant des avancées médicales en médecine humaine et de l'accessibilité croissante des agents chimio-thérapeutiques, des molécules telles que la vincristine, le cyclophosphamide, le carboplatine ou la L-asparaginase, sont fréquemment utilisées pour traiter les carnivores domestiques. Dans le domaine vétérinaire, les médicaments anti-cancéreux sont particulièrement utilisés pour le traitement des tumeurs dérivées du système hématopoïétique comme les lymphomes ou les leucémies. Par exemple, le protocole COP modifié qui combine la L-asparaginase, cyclophosphamide, vincristine et prednisone est courant pour le traitement de nombreux sous-types de lymphomes (Ponce, Magnol et al. 2004). Dans le cadre de certaines tumeurs, la chimiothérapie permet d'allonger la durée de vie de manière significative, de quelques semaines à plusieurs mois (la médiane de survie des chiens souffrants de lymphome T à petites cellules claires traités par polychimiothérapie

atteint 21 mois (Ponce, Magnol et al. 2004)). De plus, il est intéressant de constater que les effets secondaires endurés par les patients humains, tels que les vomissements, les épisodes de diarrhée ou la perte de cheveux, sont beaucoup moins fréquents chez les carnivores domestiques. Malheureusement, la chimiothérapie n'est en général pas curative chez les animaux de compagnie, la tumeur échappe au traitement dans la majorité des cas et, contrairement à l'homme - l'aspect financier mis à part - l'accent est mis sur la qualité de vie de l'animal plutôt que sur la simple survie.

Les thérapies conventionnelles ayant une efficacité limitée, les thérapies ciblées sont en plein essor. Certains médicaments sont déjà utilisables en clinique comme le masitinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase c-kit (Gentilini 2010) disposant d'une AMM pour le traitement du mastocytome chez le chien. Parmi ces thérapies ciblées, les immunothérapies font l'objet d'intenses investigations au rang desquelles figurent des stratégies de vaccination anti-tumorale. A l'image du vaccin Oncept® développé par Mérial pour traiter le mélanome chez le chien, ils visent à développer une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène tumorale (Grosenbaugh, Leard et al. 2011).

Le contexte scientifique étant favorable au développement de nouvelles stratégies immunothérapeutiques, l'objet de ce travail est donc de voir en quoi un vaccin ADN ciblant un antigène associé aux tumeurs, la TERT (Telomerase Reverse Trasncriptase), présente un intérêt pour une utilisation future en oncologie vétérinaire.

Nous allons donc voir, dans un premier temps, quelles sont les données publiées dans la littérature scientifique qui permettent de penser qu'il existe un intérêt à développer un tel vaccin. Dans cette première partie, nous verrons d'abord quelles sont les relations qu'entretiennent le système immunitaire et les cancers. Puis nous nous intéresserons aux immunothérapies dont le développement est en plein essor dans le domaine de la cancérologie. Ensuite nous verrons en quoi la TERT constitue un antigène associé aux tumeurs particulièrement pertinent dans le cadre du développement d'une immunothérapie anticancéreuse. Et enfin, nous nous pencherons sur les vaccins ADN et nous verrons en quoi ils constituent un mode de vaccination d'avenir.

Dans un second temps nous exposerons les premières données expérimentales relatives à trois vaccins ADN encodant les TERT canine, féline ou une TERT hybride entre

ces deux dernières. Nous verrons que ces constructions sont fonctionnelles et présentent une innocuité in-vitro, et qu'elles sont immunogènes in-vivo en modèle murin. Enfin nous verrons qu'il existe chez le chien sain, un répertoire de lymphocyte T spécifique de la TERT canine, ce qui rend d'autant plus pertinent le développement d'un vaccin dirigé contre cet antigène.

Pour conclure nous nous intéresserons à l'avenir de ces trois candidats vaccins. Les étapes menant à leur arrivée en clinique sont encore nombreuses et, après cela, leur utilisation en coordination avec les autres modalités thérapeutiques en cancérologie est un très vaste domaine à explorer. Enfin, comme certaines tumeurs humaines et animales présentent des similarités biologiques et moléculaires, la médecine humaine pourrait tirer profit de l'expérience acquise par l'utilisation de ces vaccins chez l'animal.

Partie 1 :

Etude bibliographique

Partie 1 : Etude Bibliographique

I. Relations entre cancer et système immunitaire

L'idée d'une relation entre les cancers et le système immunitaire n'est pas nouvelle. En effet, depuis le 19ème siècle et les travaux de Virchow en 1863, on sait que les tumeurs ne sont pas constituées uniquement de cellules néoplasiques, mais qu'elles contiennent également différents types cellulaires dont notamment des leucocytes (figure 1). Dès lors, la notion d'une immunité anti-tumorale s'est développée : le système immunitaire serait capable de reconnaître et détruire spécifiquement les cellules cancéreuses comme il le ferait avec un micro-organisme pathogène. Cependant, les relations entre le système immunitaire et les tumeurs sont plus complexes. Comme nous allons le voir, il est capable dans certaines conditions de lutter contre les néoplasies mais il est également impliqué dans le développement des maladies cancéreuses.

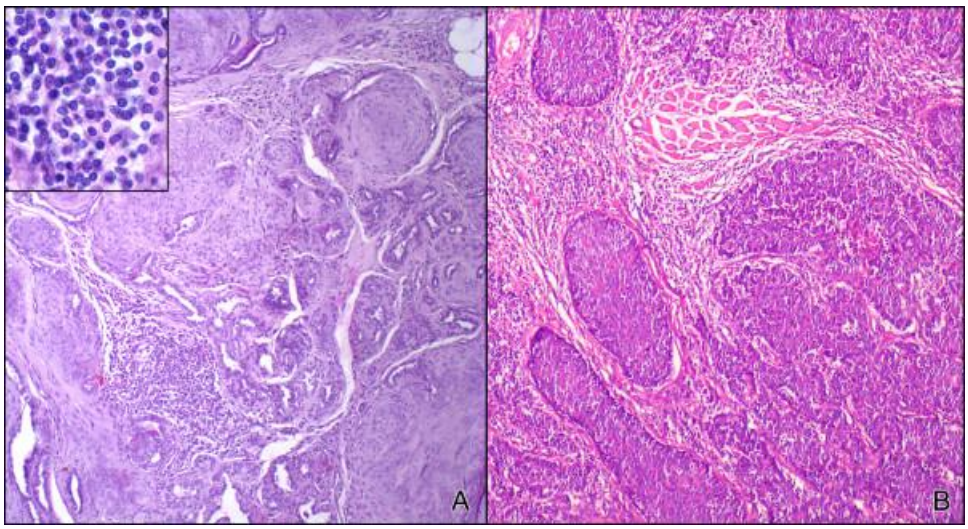

Figure 1 : Lymphocytes infiltrant des tumeurs mammaires canines

(A) Vue au faible grossissement (x 200), d'une tumeur mammaire classée parmi les tumeurs bénignes mixtes, associée à un infiltrat lymphocytaire multifocal. En insert, l'infiltrat lymphocytaire est observé au fort grossissement (x 600).
(B) Vue au faible grossissement (x 200), d'un carcinome mammaire associé à un infiltrat lymphocytaire diffus.

Coupes histologiques de 4µm d'épaisseur colorées à l'hemalun-éosine. (Estrela-Lima, Araujo et al. 2010)

a. Immunité anti-tumorale et immunosurveillance

Le rôle le plus communément attribué au système immunitaire dans le cadre des maladies cancéreuses est de les combattre : c'est l'immunité anti-tumorale, qui s'exprime dans un premier temps en exerçant une surveillance et un contrôle de la prolifération des cellules tumorales. C'est Paul Ehrlich qui, en 1909, a initié le débat relatif à ce concept d'immunosurveillance en disant que le système immunitaire réprimait la croissance tumorale sans quoi la fréquence des cancers serait plus grande (Ehrlich 1909). Cinquante ans plus tard, l'expérience acquise dans l'immunologie des tumeurs et des transplantations a permis à F. Macfarlane Burnet et Lewis Thomas de reconsidérer cette théorie : Pour Burnet, une tumeur exprime des néoantigènes pouvant provoquer une réponse immunitaire capable d'éliminer les cellules malades (Burnet 1957) et pour Thomas cette réponse est similaire à celle qui est à l'origine du rejet d'un greffon (Thomas 1959).

Lors des premières étapes de la tumorigénèse, les mutations accumulées par les cellules précancéreuses entrainent la production de protéines modifiées. Lorsqu'une partie des cellules meurt, ces néo-antigènes sont relargués dans le microenvironnement tumoral et pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA : cellules dendritiques et macrophages en particulier). Ils sont alors apprêtés dans le cytoplasme des CPA puis associés à des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et transloqués sur la membrane plasmique afin d'être présentés aux lymphocytes T spécifiques. Ce mécanisme aboutit à l'activation des différentes catégories de lymphocytes T, et notamment des CTL, lymphocytes T à fonction cytotoxique. Ceux-ci vont alors reconnaître les néo-antigènes associés aux antigènes du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales et relarguer des molécules cytotoxiques telles que le granzyme ou la perforine afin de les lyser spécifiquement (figure 2). En parallèle, les cellules en cours de cancérisation peuvent présenter des modifications concernant leur panel de protéines membranaires comme une diminution de l'expression des antigènes du CMH de classe I ou une augmentation des protéines liées au stress cellulaire. Ces variations sont détectées par les cellules Natural Killer (NK) via leur Killing Inhibitory Receptors (KIR) ou leur Killing Activation Receptors (KAR), ce qui provoque la lyse des cellules tumorales. Ces deux mécanismes principaux de l'immunosurveillance permettent de détruire les cellules en cours de cancérisation et de stopper ainsi l'oncogenèse (Dunn, Bruce et al. 2002; Dunn, Old et al. 2004; Smyth, Dunn et al. 2006). On peut noter que d'autres mécanismes et d'autres cellules de l'immunité innée ou

adaptative, comme les lymphocytes Tγδ, interviennent dans la veille anti-tumorale mais ces mécanismes sont moins bien connus et moins décrits dans la littérature (Hayday 2009).L'importance de l'immunosurveillance dans la tumorigénèse est particulièrement soulignée par le fait que le risque de développement d'un lymphome ou d'une tumeur solide est plus élevé chez les immunodéprimés (Shankaran, Ikeda et al. 2001)

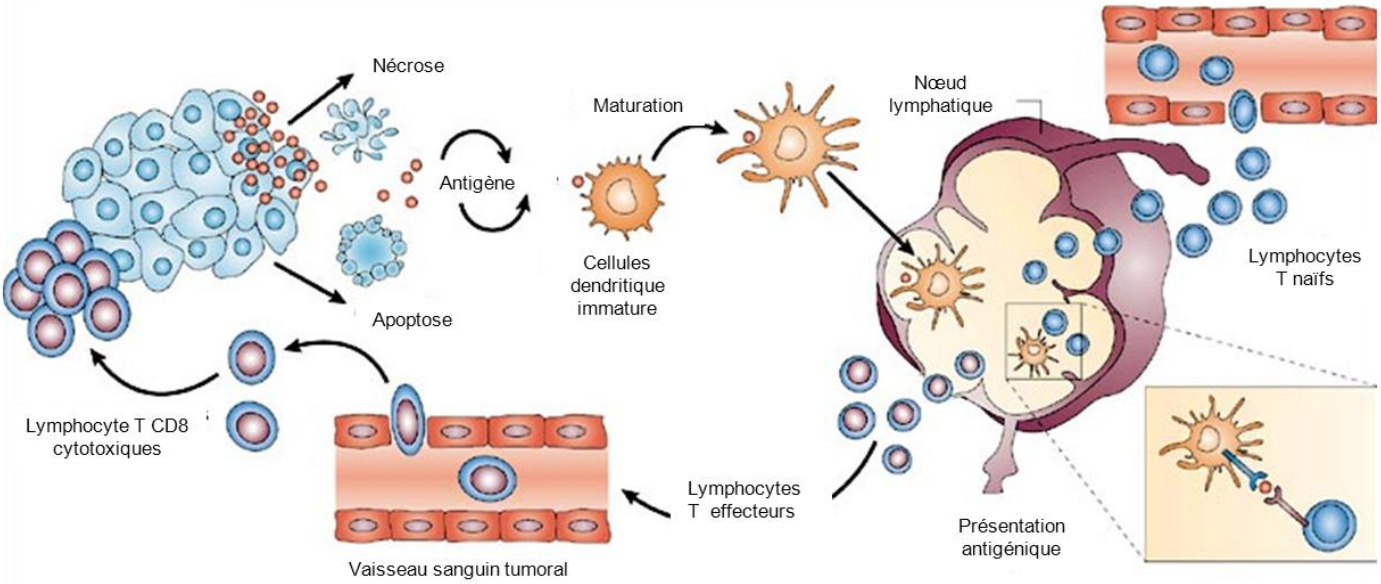

Figure 2 : Mise en place de la réponse T cytotoxique anti-tumorale

L'évolution de la tumeur et de son microenvironnement est à l'origine de la nécrose ou de l'apoptose d'une partie des cellules tumorales, relarguant de cette manière des néo-antigènes tumoraux dans le milieu extracellulaire. Ces molécules sont prises en charge par des cellules dendritiques et provoquent la maturation et la migration de ces cellules présentatrices d'antigènes dans le nœud lymphatique drainant la région. Une fois apprêté et associée à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, le néo-antigène tumoral est présenté à un lymphocyte T $CD8^+$ spécifique dans un contexte immuno-activateur. Une fois activés les lymphocytes T vont subir une première phase d'expansion clonale puis rejoindre la tumeur via les vaisseaux sanguins tumoraux où ils vont exercer leur activité cytotoxique en ciblant spécifiquement les cellules tumorales. (Castano, Mroz et al. 2006)

Lorsque la tumeur est déjà en place, il arrive que les variations antigéniques à l'intérieur du pool de cellules tumorales permettent au système immunitaire de les reconnaître et de les détruire. La preuve d'une réponse immunitaire anti-tumorale provient d'abord de multiples expériences menées en modèle murin montrant qu'un déficit immunitaire était à l'origine d'un développement tumoral exacerbé. Il a par exemple été montré que des souris présentant une mutation dans le gène RAG-2 développaient des sarcomes plus rapidement et avec une fréquence plus grande que les souris sauvages suite à l'injection sous-cutanée de 3-methylcholanthrène, un carcinogène chimique (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Le gène (RAG)-2 encode une sous-unité d'une enzyme indispensable au réarrangement des gènes impliqués dans la synthèse des récepteurs T ou B, ainsi les souris RAG-2 -/- sont incapables

de produire des lymphocytes T (αβ ou γδ), B ou des cellules NKT périphériques (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Par la suite d'autres études menées sur des tumeurs humaines ont montré que l'infiltration de certaines tumeurs par des lymphocytes capables de reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux est associé à un meilleur pronostic (Dunn, Old et al. 2004). D'autres preuves indirectes mais plus spectaculaires proviennent de cas de régression tumorale spontanée à l'intérieur desquelles on retrouve des anticorps et des lymphocytes cytotoxiques (Swann and Smyth 2007), cependant l'implication du système immunitaire dans la suppression tumorale est difficile à mettre en évidence. Le système est donc capable de lutter contre les tumeurs mais il permet rarement de stopper le développement de la maladie.

Ainsi, comme le laissait supposer les premières observations de Virchow, le système immunitaire peut être vu comme un système de protection vis-à-vis des cancers. Cependant, comme nous allons le voir, en exerçant une pression de sélection sur une population tumorale hétérogène, il va favoriser la prolifération des cellules cancéreuses les plus à même d'échapper à son action, c'est l'immunosélection.

b. Immunité et réaction inflammatoire pro-carcinogène

Aujourd'hui il est généralement accepté qu'un microenvironnement inflammatoire est nécessaire au développement de toutes les tumeurs (Mantovani, Allavena et al. 2008), et, les cas de cancers provoqués par un processus inflammatoire chronique sont de plus en plus documentés. On peut citer, à titre d'exemple, l'inflammation chronique due aux germes commensaux *Bacteroides sp.* à l'origine de cancers du côlon (Wu, Rhee et al. 2009). Dans ce cas, un micro-organisme est impliqué dans le processus de tumorigénèse mais, il arrive qu'aucun agent figuré ne soit identifié et donc que le système immunitaire, seul, semble être à l'origine d'une inflammation chronique et de la cancérisation (Waldner and Neurath 2009). De même il a récemment été montré que la fumée de cigarette n'était pas promotrice de tumeur uniquement du fait des carcinogènes qu'elle contient, mais également car elle a la faculté de provoquer une inflammation broncho-pulmonaire chronique (Takahashi, Ogata et al.). Les mécanismes liant inflammation et oncogenèse ne sont pas entièrement compris mais il semble qu'en augmentant la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en réactifs intermédiaires nitrés (RNI) susceptibles de causer des dommages à l'ADN, l'inflammation augmente la probabilité d'apparition de mutations (Hussain, Hofseth et al. 2003).

Or cette réaction inflammatoire pro-oncogène est intimement liée aux cellules de l'immunité innée et acquise. En effet on retrouve dans le microenvironnement tumoral des macrophages, des polynucléaires neutrophiles, des mastocytes, des cellules dendritiques ainsi que des Lymphocytes T, B et NK (de Visser, Eichten et al. 2006). De plus il existe désormais des preuves que les cellules dont nous pensions qu'elles avaient uniquement des vertus protectrices vis-à-vis des processus tumoraux tels que les cellules T $CD8^+$ (Roberts, Ng et al. 2007), les $CD4^+$ Th1 productrices d'IFN-γ (Hanada, Kobayashi et al. 2006) ou les CD4 Th17 (Wang, Yi et al. 2009), étaient aussi impliquées dans la carcinogenèse, la progression tumorale et l'évolution métastatique. A l'inverse, les T-reg, que nous pensions pro-tumorigènes en inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale (Gallimore and Simon 2008) auraient également, dans certaines circonstances, des propriétés anti-tumorigènes en supprimant l'inflammation pro-carcinogène (Erdman, Sohn et al. 2005).

Les raisons qui font qu'un même type cellulaire soit tantôt pro-cancérigène tantôt anti-cancérigène restent en majeure partie inconnues. Cependant les recherches actuelles tendent à montrer que, plus que le type cellulaire impliqué, c'est l'environnement cytokinique qui semble primer. En effet, il a été montré dans plusieurs modèles que la présence de certaines cytokines inflammatoires est à relier avec une augmentation de l'incidence de certaines tumeurs. Par exemple, il semble que l'augmentation de la concentration en TNF-α et Il-6 liée à l'obésité soit en relation avec à la mise en place de carcinomes hépatocellulaires (Park, Lee et al.). De même IL-23 serait impliqué dans l'apparition de cancers de la peau (Langowski, Zhang et al. 2006). Nous pouvons également noter l'importance des macrophages associés aux tumeurs (TAMs), qui, en produisant de l'angiopoïétine 2 et du VEGF, favorisent la néoangiogenèse et par voie de conséquence, la croissance tumorale (Kujawski, Kortylewski et al. 2008). Et pour en finir avec ces quelques exemples, nous pouvons citer la production des métallo-protéases MMP2 et MMP9 par les cellules myéloïdes $CCR1^+$ associées aux cancers du côlon (Kitamura, Kometani et al. 2007) qui, en dégradant la matrice extracellulaire favorise la diffusion métastatique responsable de 90% de la mortalité des maladies cancéreuses.

Enfin, nous pouvons remarquer que nombre des particularités antigéniques et enzymatiques des cellules tumorales sont en partie le fait de l'action du système immunitaire : c'est le concept d'immunoediting (Dunn, Bruce et al. 2002; Dunn, Old et al. 2004; Smyth, Dunn et al. 2006). Selon cette théorie, la pression de sélection du système immunitaire

entrainerait une édition antigénique et enzymatique constante des cellules tumorales. En effet, les cellules cancéreuses les plus immunogènes étant détruites par le système immunitaire, celles qui portent les antigènes les moins immunogènes et/ou expriment des enzymes permettant l'expression de composés immunosuppresseurs serait les seules à proliférer. En réponse à cela, le système immunitaire s'adapterait continuellement à l'antigénicité de la tumeur en produisant de nouveaux clones effecteurs spécifiques des néo-antigènes tumoraux. Cette situation d'équilibre se poursuivrait alors jusqu'à ce que les cellules tumorales n'expriment que des antigènes très peu immunogènes. Il en ressort alors une tumeur composée de cellules peu immunogènes et présentant une agressivité supérieure au néoplasme initial (figure 3). Ce modèle trouve sa justification expérimentale dans le fait que les tumeurs provenant de souris immunodéprimées étaient plus immunogènes que les mêmes types tumoraux extraits de souris immunocompétentes (Shankaran, Ikeda et al. 2001).

Cette immunosélection des antigènes tumoraux n'est pas la seule résultante de l'interaction entre la tumeur et le système immunitaire. Les cellules présentant des modifications dans les voies de signalisations impliquées dans la présentation antigénique peuvent également être favorisées par l'action du système immunitaire : des molécules telles que TAP1 ou encore les sous-unités du protéasome LMP2 et LMP7 sont déficientes dans plusieurs tumeurs humaines (Seliger, Maeurer et al. 2000). Les cellules tumorales capables de sécréter des molécules immunosuppressives telles qu'IDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) vont proliférer plus facilement en inhibant la réponse T (Uyttenhove, Pilotte et al. 2003). Enfin, si le système immunitaire favorise la prolifération des cellules peu immunogènes, la tumeur semble en retour favoriser la prolifération et l'action de populations de lymphocytes T-régulateurs (Terabe and Berzofsky 2004). Des études menées en modèle murin ont montrées que des souris dont on a éliminé la population régulatrice $CD4^{+}CD25^{+}$ à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-CD25, étaient capables de rejeter la tumeur qu'on leur avait greffée, contrairement aux souris contrôles chez qui la tumeur a continué à croître (Onizuka, Tawara et al. 1999; Shimizu, Yamazaki et al. 1999). En favorisant l'action de telles populations cellulaires, les tumeurs corrompent le fonctionnement de l'immunité anti-tumorale. Ainsi, lorsque les cellules cancéreuses ont accumulé assez de modifications moléculaires en général et antigéniques en particulier, et qu'elles sont parvenues à subvertir le système immunitaire, la tumeur échappe au contrôle de ce dernier et prolifère indépendamment de la réponse immune.

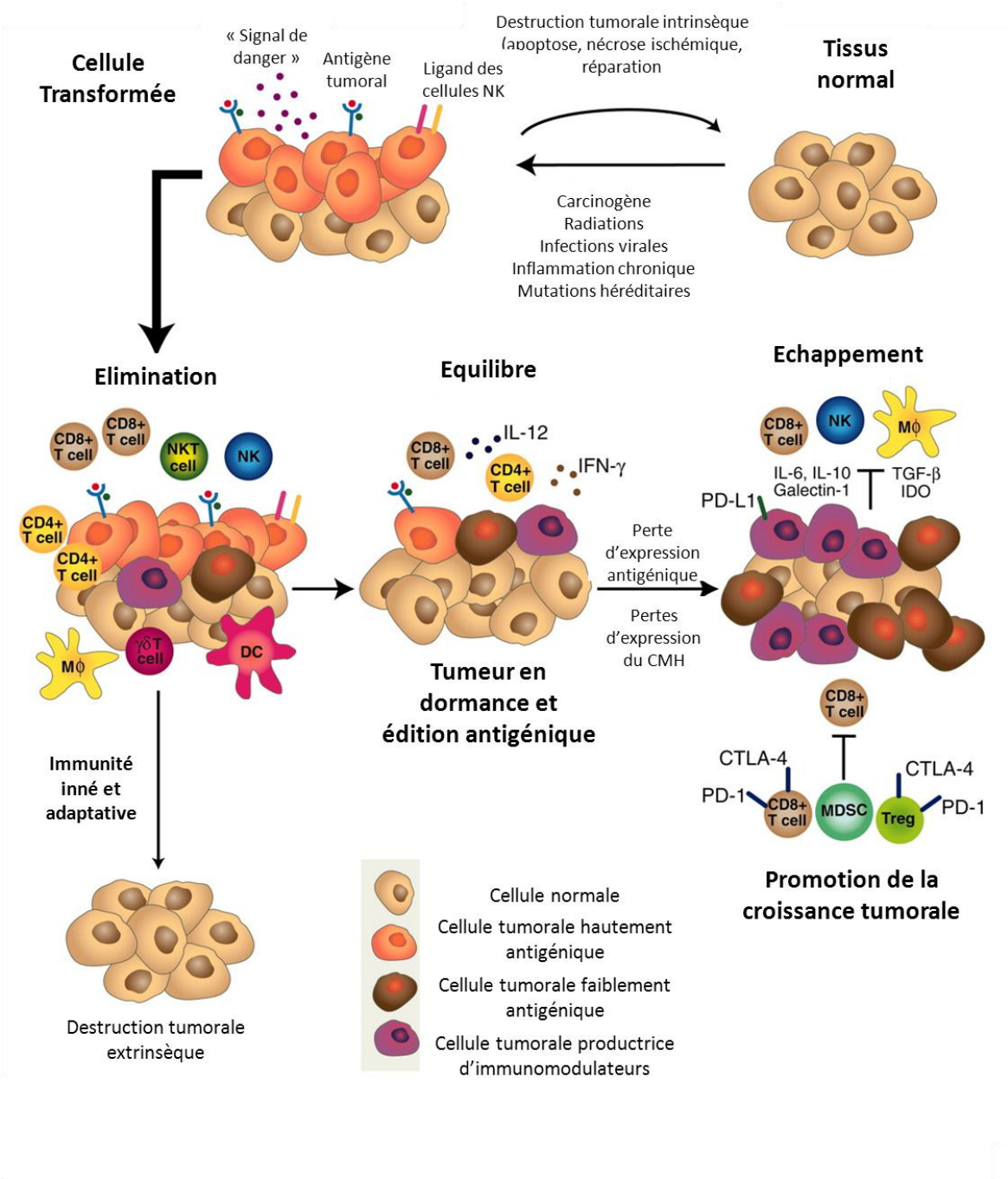

Figure 3: Evolution des relations tumeur - système immunitaire

Suite à la transformation cellulaire et l'échec des phénomènes de réparation cellulaire, la tumeur en développement est détectée par le système immunitaire. Dans un premier temps la majorité des cellules tumorales hautement antigéniques vont être détruites, c'est la phase d'élimination. La pression de sélection imposée par le système immunitaire va favoriser l'émergence et la multiplication de cellules tumorales faiblement antigénique ou capable de produire des molécules immunomodulatrices. La tumeur et le système sont d'abord en équilibre avant que la tumeur n'échappe à l'action de ce dernier. $CD8^+$ T cell = lymphocyte T CD8 ; $CD4^+$ T cell = lymphocyte T CD4 ; NK = lymphocyte NK ; NKT = lymphocyte NKT ; γδ T cell = lymphocyte T γδ ; Treg = lymphocyte T régulateur ; DC = cellule dendritique ; MΦ = Macrophage ; MDSC = cellules immunosuppressive d'origine myéloïde. (Dunn, Old et al. 2004)

En définitive, le système immunitaire est capable de lutter contre le cancer. Mais, en partie à cause de son action, les tumeurs qui parviennent à se développer sont celles qui réussissent à lui échapper. Ainsi, le but des thérapies ciblées anti-tumorales à médiation cellulaire est de contourner ces difficultés, en provoquant l'expansion et l'activation de précurseurs lymphocytaires naturellement peu fréquents car spécifiques d'antigènes peu immunogènes. Cependant, on peut également s'attendre à ce que la simple expansion de clones effecteurs ne soit pas suffisante pour constater un bénéfice substantiel. La masse tumorale peut représenter un obstacle : même une grande quantité de cellules effectrices peut être surpassée par une tumeur trop volumineuse. Enfin, le contexte micro-environnemental, en s'enrichissant en molécules et en cellules régulatrices de la réponse immune, évolue souvent de manière défavorable aux effecteurs anti-tumoraux. Il sera donc nécessaire de prendre en compte l'ensemble de ces facteurs afin de juger de l'effet des thérapies ciblées anti-tumorales à médiation cellulaire et afin d'optimiser leur utilisation.

II. Immunothérapies anticancéreuses

Du fait des vertus immunosuppressives des thérapies anti-tumorales conventionnelles du cancer, et en particulier de la chimiothérapie et de la radiothérapie, les immunothérapies ont été longtemps laissées pour compte. Cependant aujourd'hui, la volonté générale est de développer des thérapies plus spécifiques et avec moins d'effets secondaires. Ainsi, l'amélioration des connaissances et des techniques d'exploration du système immunitaire entrainent un regain d'intérêt pour ces options thérapeutiques qui en théorie répondent à ces attentes. Nous verrons ici d'abord les principes généraux des immunothérapies anticancéreuses, puis celles qui sont d'ores et déjà disponibles, pour terminer par celles qui le seront bientôt, en oncologie vétérinaire.

a. Principe général des immunothérapies anticancéreuses.

Nous pouvons séparer les immunothérapies en deux catégories de substance : les immunomodulateurs et les immunothérapies spécifiques de cible.

i. Les immunomodulateurs

Le principe de fonctionnement des immunomodulateurs est, comme leur nom l'indique, de moduler la réponse immunitaire en place dans le but de l'orienter vers une action anti-cancéreuse.

Les connaissances grandissantes concernant le microenvironnement tumoral et la physiologie de la réponse immunitaire ont permis d'ouvrir des perspectives thérapeutiques utilisant certaines cytokines, des médiateurs des communications intercellulaires, pour leur capacité à orienter la réponse immunitaire. On comprend aisément qu'en matière de thérapie anticancéreuse, ce sont les cytokines de la voie Th1 comme l'Il-2 (Antony and Dudek 2010), l'IL-12 (Sangro, Mazzolini et al. 2004) ou des molécules de la famille des interférons (Wang, Rahbar et al. 2011), favorisant l'immunité à médiation cellulaire qui sont utilisées préférentiellement avec une efficacité discutable, le but étant de favoriser une rupture de tolérance vis-à-vis de la tumeur. Elles ne sont en général pas utilisées seules, dans la plupart des cas il s'agit d'un traitement adjuvant, comme l'IL2 et de l'IL-15 qui, utilisées en

combinaison avec l'anticorps agoniste anti-CD40, peuvent conduire à une régression tumorale chez des souris atteints de cancer rénal métastatique (Weiss, Back et al. 2009).

Un certain nombre de cytokines à fonction de facteur de croissance présentent également des propriétés intéressantes. Le GM-CSF, un facteur de croissance des lignées monocytaire et granulocytaire, est utilisé en tant qu'adjuvant de certains vaccins thérapeutiques (Machiels, Reilly et al. 2001), le but étant de favoriser l'afflux de cellules présentatrices d'antigènes afin d'optimiser la vaccination. L'IL-7, un facteur de croissance affectant cette fois-ci la lignée lymphocytaire est également utilisée en complément d'une vaccination ciblant des antigènes tumoraux afin d'antagoniser la voie immunosuppressive engendrée par le relargage de TGF-β dans le microenvironnement tumoral (Pellegrini, Calzascia et al. 2009).

Comme nous l'avons vu plus haut, certaines cellules associées au système immunitaire peuvent favoriser le développement des tumeurs notamment en produisant des enzymes immunosuppressives. En effet, il a été montré que les macrophages associés aux tumeurs qu'on appelle également dérivés cellulaires myéloïdes suppresseurs sécrètent dans le microenvironnement tumoral, des enzymes immunosuppressives tels que IDO, iNOS ou encore IL-4i1. En agissant via diverses voies métaboliques, ces enzymes placent la tumeur dans un contexte immunosuppressif qui favorise son développement. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes a montré un réel intérêt dans le cadre des immunothérapies anti-tumorales (Lasoudris, Cousin et al. ; Sato, Saga et al. ; Watanabe, Kawamori et al. 2000).

En marge de ces immunothérapies immunomodulatrices classiques, il existe d'autres thérapies que l'on peut classer parmi les immunomodulateurs, même si leur mécanisme d'action reste encore à éclaircir. Dans le cadre des carcinomes transitionnels de la vessie, par exemple, l'instillation intra-vésicale du bacille de Calmette et Guérin (BCG) a montré une réelle efficacité lorsqu'il n'y a pas envahissement du tissu musculaire (Griffiths 2012). Le mécanisme d'action est encore mal connu, mais il semblerait que le BCG provoquerait une réaction inflammatoire locale à l'origine d'une réponse immunitaire faisant intervenir des cellules dendritiques exprimant de l'IL-12 et du TNF-α, ainsi que des cellules NKT (Higuchi, Shimizu et al. 2009). On peut également citer l'exemple de l'utilisation de *Propionibacterium acnes*, une bactérie responsable de l'acné chez l'homme, qui en induisant une forte réponse Th1, engendre une forte réponse anti-tumorale dans un modèle murin de mélanome malin

(Tsuda, Yamanaka et al. 2011). Ces modalités thérapeutiques sont caractérisées par leur capacité à perturber l'équilibre en place entre l'hôte et la tumeur à différents niveaux. A ce titre, on les qualifie dans la littérature, de modificateurs de la réponse biologique

Comme nous l'avons vu, les thérapies immunomodulatrices ont pour but de modifier l'action du système immunitaire déjà en place afin de la faire basculer vers un rejet de la tumeur grâce à l'introduction d'un élément exogène non spécifique de la tumeur. Nous allons maintenant nous intéresser aux immunothérapies spécifiques d'une cible moléculaire donnée qui ont pour principe d'utiliser un ou plusieurs antigènes afin de diriger la réponse anti-tumorale.

ii. Les immunothérapies spécifiques de cible

Les chefs de fils de cette catégorie de thérapie sont les sérothérapies et, en ce qui concerne le domaine de l'oncologie, l'utilisation d'anticorps monoclonaux de synthèse. Il a en effet été montré que l'utilisation de ces anticorps permettait d'obtenir une bonne réponse clinique ainsi que des bénéfices en termes de survie chez certains patients si bien qu'aujourd'hui 22 anticorps sont approuvés pour une utilisation en clinique par la FDA dont 9 comportent une indication en oncologie. A titre d'exemple, nous pouvons citer le Rituximab, anticorps spécifique du CD20 humain (figure 4), couramment utilisé dans le traitement du lymphome de Hodgkin chez l'homme ou encore le Trastuzumab, spécifique de l'antigène HER2/Neu, utilisé dans le traitement de certains cancers du sein. Ces anticorps ont une action directe vis-à-vis des cellules tumorales en inhibant une activité biologique essentielle à la tumeur, ou par opsonisation ce qui favorise sa lyse par des cellules cytotoxiques, ou sa phagocytose par des cellules phagocytaires (Nahta and Esteva 2006). Il a par ailleurs été montré récemment que les anticorps monoclonaux pouvaient aussi provoquer une réponse T via la présentation croisée d'antigènes du soi libéré par la cytolyse dépendante des anticorps (Harbers, Crocker et al. 2007).

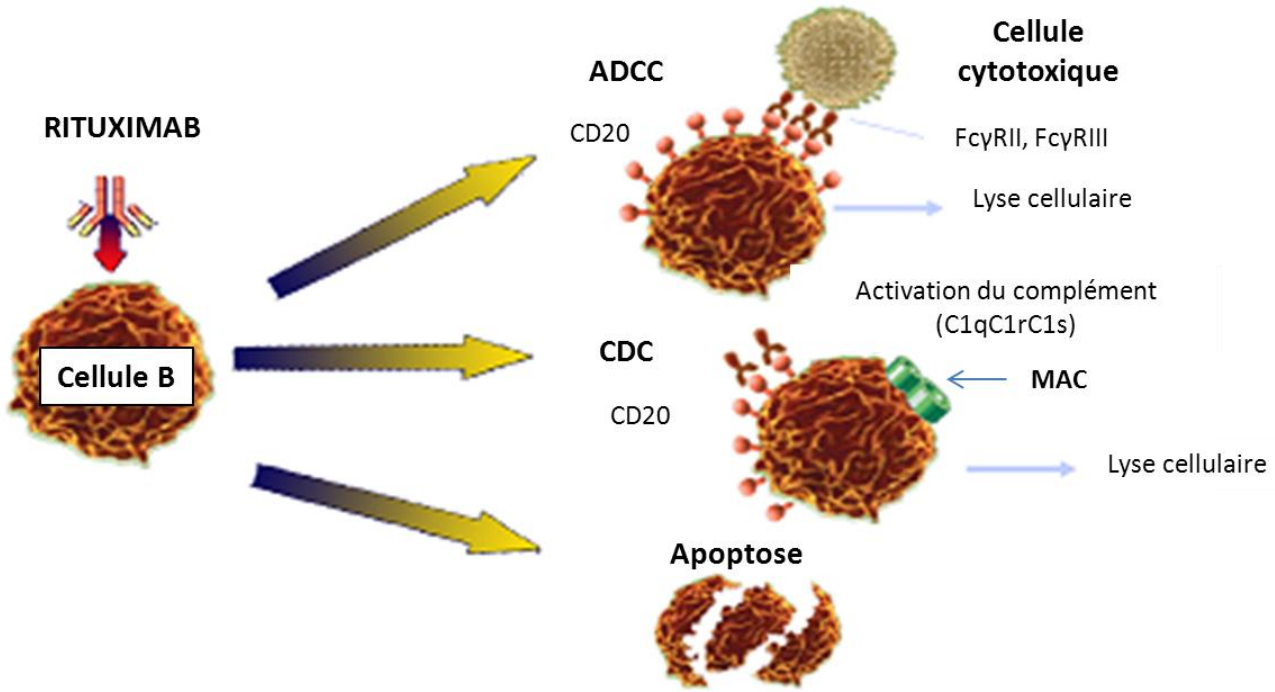

Figure 4 : Modes d'action du Rituximab

Le rituximab a une action cytotoxique à l'encontre des cellules tumorales exprimant le CD20. Il active la fonction cytolytique des cellules exprimant les récepteurs membranaires FCγRII ou FcγRIII, c'est-à-dire les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules NK et les macrophages. Ce mécanisme est appelé ADCC (Antibody Dependant Cell Cytotoxicity). Une fois fixé sur sa cible, le rituximab active le système du complément par la voie classique qui aboutit à la lyse de la cellule cible via la mise en place du complexe d'attaque membranaire (MAC) par le mécanisme de cytotoxicité dépendante du complément (CDC). (Golay, Zaffaroni et al. 2000)

Si historiquement les anticorps monoclonaux étaient utilisés pour cibler et tuer directement les cellules tumorales, l'évolution des connaissances en immunologie fondamentale a permis de développer des anticorps modulants la réponse immunitaire (on peut d'ailleurs aussi les classer parmi les immunomodulateurs). Ils ciblent principalement des corécepteurs activateurs ou inhibiteurs situés sur les lymphocytes T activés et ont pour principe d'accentuer un signal activateur des lymphocytes T effecteurs, ce sont des anticorps agonistes, ou de limiter un signal inhibiteur, ce sont des anticorps antagonistes (Wolchok, Yang et al.). Le prototype même de ces anticorps immunomodulateurs est l'ipilimumab. Il cible CTLA-4, un corécepteur membranaire des lymphocytes T qui régule négativement

l'activation et la fonction des lymphocytes T. L'utilisation de l'ipilimumab a montré une augmentation de la durée de survie des patients atteints de mélanome métastatique traités au cours d'un essai clinique randomisé de phase III (Hodi, O'Day et al. 2010). On peut également citer à titre d'exemple l'anticorps antagoniste anti-PD-1 dont l'utilisation au cours d'essais clinique de phase I a montré qu'il était bien toléré et qu'il permettait d'obtenir une réponse clinique objectivable (Brahmer, Drake et al.) ou encore l'anticorps agoniste anti-CD40 dont l'activité clinique a également été démontrée dans le cadre du lymphome non-hodgkinien (Advani, Forero-Torres et al. 2009) ou du carcinome pancréatique (Beatty, Chiorean et al.). Malheureusement, même si des résultats cliniques sont démontrés, l'utilisation de ces anticorps immunomodulateurs est sujette à controverse. Par exemple, concernant l'ipilimumab, il été montré que son utilisation provoquait une augmentation du nombre total de lymphocytes T régulateurs ce qui pourrait favoriser un repeuplement tumoral et compromettre l'effet thérapeutique à long-terme (Kavanagh, O'Brien et al. 2008).

Le second grand versant des immunothérapies cible spécifique est constitué par l'ensemble des vaccins thérapeutiques anti-cancer qui ont pour objectif commun d'éduquer le système immunitaire afin de le rendre capable de reconnaître et détruire spécifiquement les cellules porteuses de l'antigène vaccinal. On peut noter que cette stratégie est employée couramment en prophylaxie anti-infectieuse depuis la première vaccination antivariolique par Edward Jenner en 1796, et avec beaucoup de succès car certaines maladies comme la poliomyélite ou la diphtérie ont désormais quasiment disparue dans les pays dans lesquelles la vaccination est largement pratiquée comme aux Etats-Unis (Nabel 2013). Et enfin, on ne peut pas parler de vaccination thérapeutique sans citer l'efficacité du vaccin antirabique développé par Louis Pasteur et mis à l'épreuve avec succès pour la première fois en 1885 sur le désormais célèbre Joseph Meister.

La vaccination anti-cancer est basée sur l'hypothèse qu'il existe chez le patient cancéreux des lymphocytes T, $CD4^+$ et $CD8^+$, spécifiques d'antigènes exprimés uniquement par les cellules tumorales ou surexprimées par ces cellules. Le principe de tous ces vaccins est alors d'apporter cet antigène associé à la tumeur de façon à induire, activer ou amplifier la réponse immunitaire T.

Le ou les antigènes tumoraux peuvent être administrés sous la forme d'un ou plusieurs peptides (Yamada, Sasada et al. 2012), de protéines recombinantes (Basak, Eck et al. 2000),

de lysat tumoral (Hutchinson 2010), de cellules tumorales irradiées (Hellstrom and Hellstrom 2003), de vecteur microbien génétiquement modifié (Cawood, Hills et al. 2012), ou encore d'ADN ou d'ARN encodant le ou les antigènes tumoraux (Grosenbaugh, Leard et al. 2011). On compte alors sur les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, et plus particulièrement sur les cellules dendritiques pour prendre en charge le ou les antigènes tumoraux et les présenter aux lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques afin de les activer. Le statut des cellules dendritiques, et leur capacité à activer les cellules T spécifiques est par conséquent un point critique du fonctionnement des vaccins anti-cancer. Ainsi, de nombreux efforts sont réalisés aujourd'hui afin d'influencer le fonctionnement de ces acteurs charnière de la réponse immunitaire anti-tumorale soit en utilisant des adjuvants tels que le GM-CSF inclus dans les vaccins afin de les activer *in-vivo* (Soiffer, Lynch et al. 1998), soit en activant ex-vivo les cellules dendritiques préalablement chargées avec des peptides tumoraux (Hwang, Lim et al. 2012).

Le premier vaccin thérapeutique anti-cancer chez l'homme ayant complété les essais cliniques de phase III et étant approuvé par la FDA aux Etats-Unis le 29 avril 2010 est le Sipuleucel-T (Provenge®). Il est mis sur le marché avec pour indication, le traitement des cancers de la prostate résistant à la castration et utilise la phosphatase acide prostatique comme antigène vaccinal. C'est une immunothérapie patient-spécifique qui fonctionne de la manière suivante : les cellules dendritiques sont récupérées à partir du sang périphériques du patient par leucophérèse puis mis en culture dans un milieu avec l'antigène vaccinal ; les cellules dendritiques ainsi activées et chargées avec l'antigène vaccinal sont alors administrées au patient par voie intraveineuse. Les premières études ont montré une efficacité de ce traitement avec un allongement du temps de survie des patients, illustré en figure 5, de plus de 4 mois en moyenne par rapport à un placebo (Di Lorenzo, Ferro et al. 2012). Actuellement, le Sipuleucel-T n'est pas commercialisé en France principalement du fait de son coût.

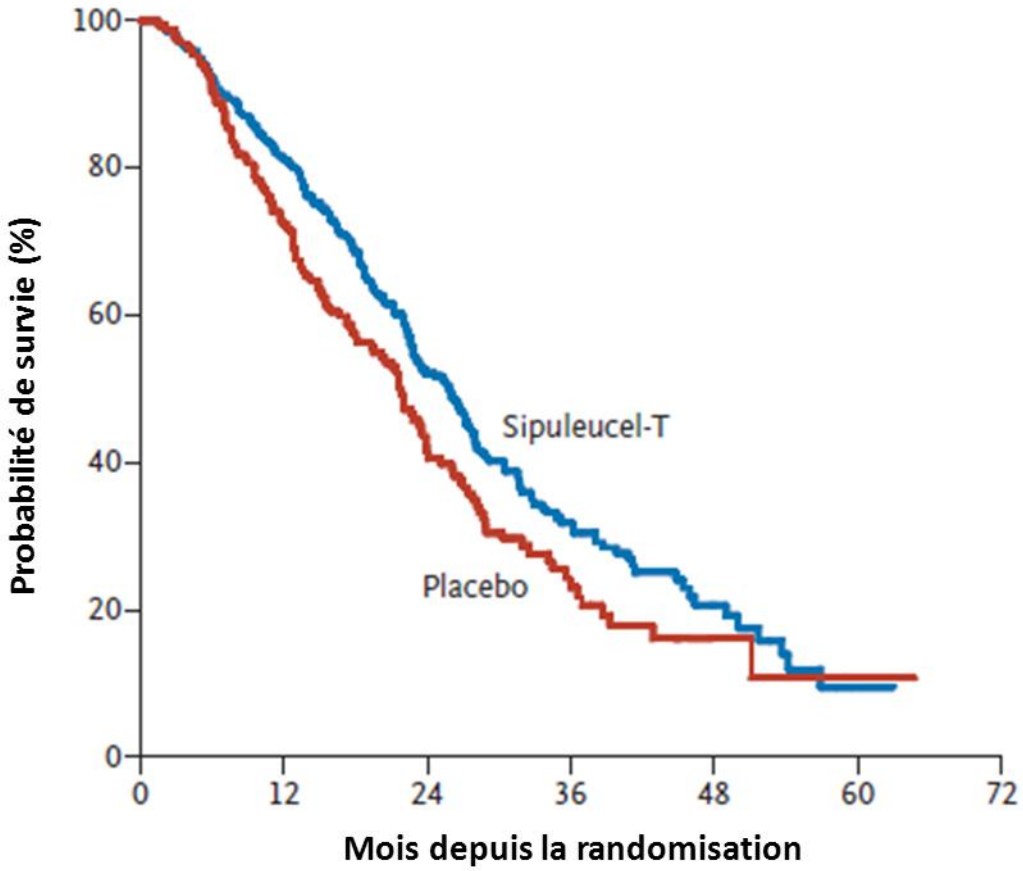

Figure 5 : Courbes de survie de Kaplan-Meier concernant des patients atteints de tumeur prostatique résistante à la castration traités avec l'immunothérapie Sipuleucel T ou un placebo

Tous les patients ont subi 3 leucophérèses (semaine 0, 2 et 4 post randomisation) suivi trois jours plus tard par une transfusion de Sipuleucel T (cellules dendritiques issues du patient activées ex-vivo) ou d'un placebo (PBMC issue de la leucophérèse). Le groupe traité avait une médiane de survie de 25,8 mois contre 21,7 mois pour le groupe placebo ce qui représente un allongement de 4,1 mois. Le traitement Sipuleucel T permet une réduction du risque de mort de 22%. La probabilité de survie à 36 mois est de 31,7% avec le traitement contre 23% avec le placebo. (Kantoff, Higano et al. 2010).

Enfin, même si elles sont plus lourdes à mettre en place, il est aussi important de parler des thérapies cellulaires utilisées en cancérologie. Le principe de base de ces thérapies est de transfuser au patient cancéreux un grand nombre de lymphocytes effecteurs spécifiques d'antigènes tumoraux. Ces cellules peuvent provenir du patient lui-même ou bien d'un donneur compatible. Les lymphocytes autologues sont généralement des lymphocytes infiltrant la tumeur, ou TILs, que l'on a stimulé ex-vivo à l'aide d'un cocktail de cytokines. Cette stratégie a déjà été utilisée pour traiter des patients atteints de mélanome métastatique en combinaison avec l'administration d'IL-2 (Besser, Shapira-Frommer et al. 2010). Le point

d'achoppement de cette thérapie est qu'elle est entièrement individualisée, donc couteuse et qu'elle dépend de la possibilité d'isolement et d'expansion des TILs provenant du patient afin d'obtenir un nombre suffisant de lymphocytes effecteurs, ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas. Pour pallier à ces problèmes, une alternative consistant à transférer des lymphocytes dérivés de cellules mononucléées du sang périphérique après les avoir transduits afin qu'ils expriment un récepteur T spécifique d'un antigène tumoral d'intérêt. Cette stratégie a montré son efficacité dans le traitement de divers cancers dont le mélanome métastatique (Robbins, Morgan et al. 2011).

Comme nous l'avons vu, l'étude des immunothérapies est en plein essor en recherche biomédicale et en médecine humaine. Nous allons maintenant voir ce qu'il en est dans le domaine vétérinaire.

b. Les immunothérapies chez les carnivores domestiques

Profitant largement des avancées en thérapeutique humaine, les connaissances et l'utilisation des immunothérapies sont également l'objet de nombreuses investigations en médecine vétérinaire.

i. Les immunomodulateurs utilisés chez les carnivores domestiques

Parmi cette catégorie de thérapies, l'effet de nombreuses cytokines telles que l'interféron oméga (Hampel, Schwarz et al. 2007), l'IL-12 (Akhtar, Padilla et al. 2004), l'IL-2 (Skubitz and Anderson 2000) ou encore l'IL-18 (Okano and Yamada 2000) a été testé sur différents types tumoraux *in-vitro* ou *in-vivo*, et elles ont montré un intérêt dans la lutte contre ces maladies. D'autre part, plusieurs modes d'administration ont été évalués afin de garantir une plus grande efficacité. Prenons, à titre d'exemple, le cas du fibrosarcome félin, pour lequel l'administration intra-tumorale d'IL-2 a montré une efficacité. Cette administration est possible par thérapie génique, en transfectant les cellules cibles *in-situ* par magnéto-transfection (Jahnke, Hirschberger et al. 2007), par thérapie cellulaire, en injectant des cellules histocompatibles exprimant l'IL-2 à l'intérieur de la tumeur (Quintin-Colonna, Devauchelle et al. 1996), ou encore en utilisant un vecteur viral, un poxvirus, encodant la cytokine féline injecté également dans la tumeur (Jourdier, Moste et al. 2003). Dans ce dernier

cas de figure la récurrence à un an de la maladie concerne 61% des animaux ne recevant pas d'immunothérapie contre 28% des chats recevant le canarypox encodant l'IL-2 féline (Jourdier, Moste et al. 2003).

Aux rangs des immunothérapies passives non spécifiques, on retrouve des agonistes des récepteurs Toll-Like (TLR), impliqué dans la reconnaissance des pathogènes. L'imiquimod (AldaraND, St Paul, MN, USA) est un agoniste du TLR 7. Une étude portant sur 12 chats atteints de carcinome épidermoïde multicentrique, traités avec de la crème à 5% d'imiquimod, a montré une réponse pour toutes les lésions, primaires ou apparues au cours de l'étude, pour l'ensemble des chats. De plus, il est apparu que la crème est très bien tolérée pour la majorité des chats (Gill, Bergman et al. 2008).

La paroi des mycobactéries contient des composés appelés muramyl dipeptides qui ont la capacité d'activer les monocytes et les macrophages tissulaires. Le muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (MTP-PE) est un analogue des muramyl dipeptides naturels. Encapsulé dans un liposome multi-lamellaire (L-MTP-PE), il peut être pris en charge par des monocytes et des macrophages du patient cancéreux et exercer un effet tumoricide en induisant le relargage de multiples cytokines dont l'IL1-α, l'IL-1β, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF-α. Le L-MTP-PE a d'ailleurs été testé sur différents types tumoraux du chien dont le carcinome mammaire (Teske, Rutteman et al. 1998), l'ostéosarcome (Kurzman, MacEwen et al. 1995) et l'hémangiosarcome (Vail, MacEwen et al. 1995). Dans ce dernier cas, l'étude menée par Vail a montré que le groupe de chiens traité avec le L-MTP-PE avaient une durée avant récidive et une survie globale significativement plus importante que le groupe de chiens ayant reçu le placebo (figure 6) ce qui pourrait être lié à une concentration sérique plus importante en TNF-α et en IL-6 : le rapport entre l'induction de ces deux cytokines et la tumoricidie n'est pas claire mais témoigne, selon les auteurs, d'une modulation de la réponse immune (Vail, MacEwen et al. 1995).

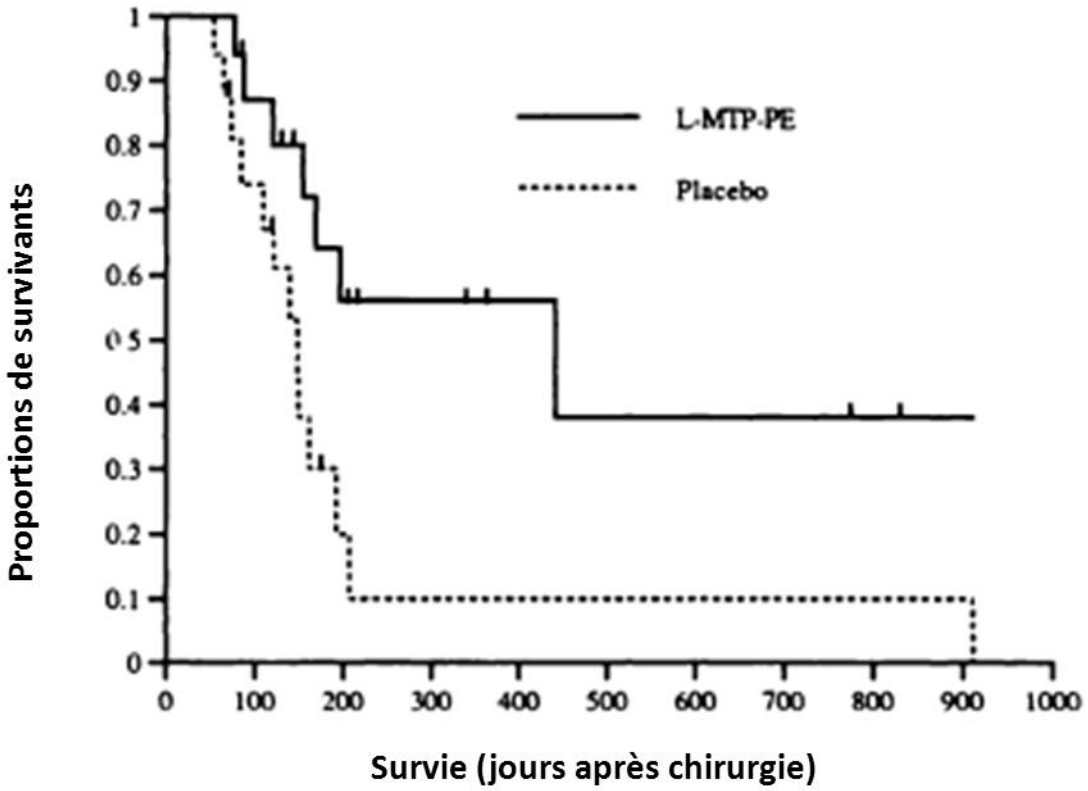

Figure 6: Survie de chiens atteints d'hémangiosarcome splénique traités avec l'immuno-modulateur L-MTP-PE ou un placebo

Trente-deux chiens atteints d'hémangiosarcome splénique confirmé par histologie et ne présentant pas de métastases mises en évidence ou de complication ont été inclus dans l'étude. Tous les chiens ont subi une splénectomie et 4 séances de chimiothérapie (doxorubicine et cyclophosphamide) espacées de 3 semaines. La moitié des chiens a reçu le liposome contenant le L-MTP-PE, et l'autre moitié a reçu un liposome contrôle. L'administration de liposome a commencé à la première séance de chimiothérapie et les administrations ont ensuite eu lieu toutes les 8 semaines. Les animaux traités avec le L-MTP-PE ont une durée de survie significativement plus longue que ceux traités avec le placebo ($p < 0,05$). (Vail, MacEwen et al. 1995)

ii. Les immunothérapies spécifiques de cible chez les carnivores domestiques

L'utilisation des anticorps monoclonaux reste malheureusement très peu développée en oncologie vétérinaire, principalement pour deux raisons. Premièrement, leur action est basée sur leur spécificité très fine vis-à-vis de leur récepteur, ce qui conduit à l'absence de réaction croisée inter-espèce. Ainsi le rituximab, largement utilisé dans le traitement des lymphomes humains n'est pas utilisable chez le chien (Impellizeri, Howell et al. 2006). D'autre part, le coût de développement et de commercialisation des anticorps monoclonaux est tel qu'aujourd'hui ils ne sont pas accessibles à la majorité des propriétaires. A titre d'exemple, au Québec, on estime qu'un cycle de rituximab à 375mg/m² pour un homme, coûte en moyenne 2984 $.

En ce qui concerne les vaccins thérapeutiques, une grande variété d'approches a été tentée à ce jour. Le ou les antigènes vaccinaux peuvent être administrés sous forme de lysats cellulaire provenant de cellules tumorales allogéniques. Cette stratégie vaccinale a été éprouvée dans le cadre de l'hémangiosarcome canin en supplément d'une chimiothérapie conventionnelle. Les résultats de l'étude ont montré que la vaccination permettait d'obtenir une réponse immune humorale à l'encontre d'antigène tumoraux (U'Ren, Biller et al. 2007). Le lysat tumoral peut également être administré sous forme de peptide directement associé à un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène, c'est ce qui est appelé vaccin DC c'est-à-dire vaccin Cellule Dendritique. Tamura et son équipe ont montré que la vaccination de chiens avec des cellules dendritiques chargées avec un lysat cellulaire provenant de la lignée de mélanome canin CMM2, provoquait une réaction d'hypersensibilité de type IV lorsque ce même lysat était utilisé pour réaliser une intradermo-réaction, et, que des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ étaient retrouvés au site réactionnel. Ces résultats suggèrent l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire dirigé contre la lignée CMM2 (Tamura, Yamada et al. 2008). Enfin, l'antigène vaccinal peut être administré sous forme de gène, directement sous forme d'ADN ou grâce à un vecteur, viral ou non viral. Ceci permet non seulement d'apporter des versions optimisées des antigènes d'intérêt (Johnston, Monteiro et al. 2005), mais aussi de les associer avec des gènes encodant des immunomodulateurs comme le GM-CSF par exemple (Bergman, Camps-Palau et al. 2006). Les principaux vecteurs viraux utilisés jusqu'alors chez le chien en cancérologie, sont des adénovirus dont la réplication est rendue impossible. Von Euler et son

équipe ont montrés que l'utilisation de vecteurs adénoviraux encodant le ligand de CD40 chez des chiens atteints de mélanome provoquait une régression tumorale et une protection contre le processus métastatique. De plus, l'examen des pièces d'exérèse a mis en évidence une infiltration du tissu tumorale par des lymphocytes T et B ce qui suggère une action du système immunitaire et pas seulement du virus (von Euler, Sadeghi et al. 2008) cependant cette information est à prendre au conditionnel car aucun chien n'a été traité avec un vecteur « placebo », par conséquent l'implication du vecteur dans l'infiltration lymphocytaire est à discuter. Quant aux vaccins ADN, bien qu'ils soient moins immunogènes que les vecteurs viraux, ils ont également montré leur efficacité chez l'animal. Bergman et son équipe, ont développé un vaccin ADN sous forme d'un plasmide encodant la tyrosinase humaine (figure 7). Injecté par voie intramusculaire ou intradermique à l'aide d'un dispositif appelé « gene-gun », il a montré un effet en termes de survie globale sur des chiens présentant un mélanome de la cavité orale de stade avancé (Bergman, McKnight et al. 2003; Grosenbaugh, Leard et al. 2011). Ainsi, le vaccin développé par Bergman et son équipe est devenu le premier et unique vaccin ADN approuvé à ce jour par la FDA et commercialisé aux Etats-Unis par la société Merial.

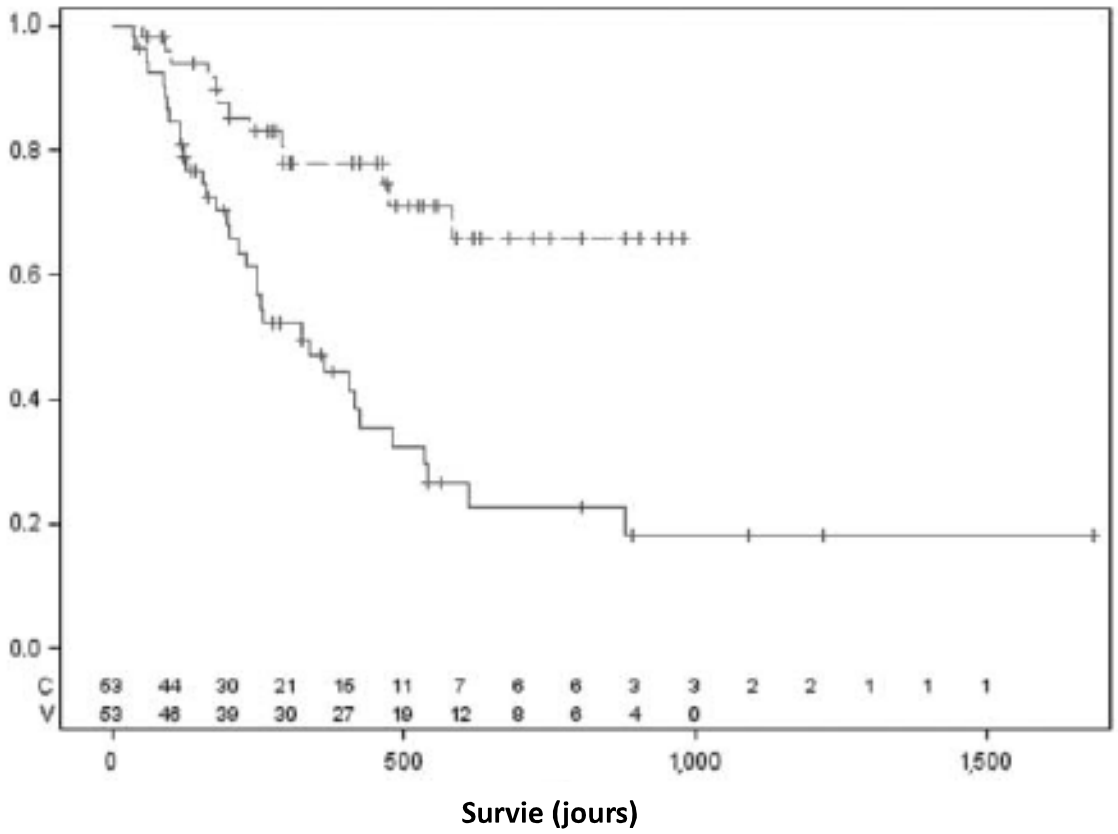

Figure 7: Courbes de survie de Kaplan-Meier chez des chiens atteints de mélanome de la cavité orale traité avec le vaccin ADN Oncept® ou avec un placebo

Les chiens inclus dans l'étude souffraient de mélanome de la cavité orale de stade II ou III dont le contrôle locorégional a été obtenu par chirurgie ou par radiothérapie. 58 chiens composaient le groupe vacciné (ligne discontinue). Ils ont reçu 4 injections de plasmide encodant la tyrosinase humaine à 2 semaines d'intervalle l'une de l'autre administré par voie intradermique à l'aide d'un « gene-gun ». Le groupe contrôle comprenait 53 chiens (ligne continue) et ont reçu des injections de placebo. Les chiens vaccinés survivants ont reçu une injection vaccinale supplémentaire 6 mois après la 4ème injection. La médiane de survie du groupe contrôle était de 324 jours. Celle du groupe vacciné n'a pas pu être déterminée car plus de 50% des chiens étaient encore vivants ou perdu de vue à la fin de l'étude. (Grosenbaugh, Leard et al. 2011)

Les immunothérapies trouvent donc de plus en plus leur place au sein de l'arsenal thérapeutique disponible contre le cancer aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Et, au sein de ces traitements, les vaccins anti-cancéreux sont particulièrement séduisants car ils mettent en jeu les effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire de façon ciblée. Ils promettent donc une action cancérolytique et l'absence d'effets adverses grâce à leur grande spécificité. La clé dans le développement de ces vaccins semble donc être de trouver un antigène vaccinal à la fois surexprimé par les cellules tumorales, faiblement voire non exprimé par les cellules saines et si possible indispensable à la survie des cellules tumorales.

III. La Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)

Les télomères des cellules eucaryotes sont des structures nucléoprotéiques particulières situées à l'extrémité des chromosomes linéaires. Dans la plupart des organismes, ils sont constitués de courtes séquences nucléotidiques répétées (TTAGGG chez les mammifères) interagissant directement ou indirectement avec des protéines. Les télomères protègent les terminaisons chromosomiques contre la fusion et la dégradation par les DNAses, et ils permettent une partition chromosomique correcte au cours de la mitose ou de la méiose (Blackburn 2001). De plus des télomères fonctionnels sont nécessaires à l'entretien de la prolifération cellulaire. En effet, lorsque des cellules somatiques sont mises en culture, l'attrition progressive des télomères s'accompagne de changement métaboliques globaux et d'un arrêt des divisions cellulaires.

Au cours de la division cellulaire, la machinerie réplicative conventionnelle est incapable de dupliquer complètement les télomères. Il en résulte une perte d'ADN à l'extrémité du chromosome car celui-ci est alors accessible aux nucléases, ce problème est connu dans la littérature sous le terme de « problème de fin de réplication » (« end replication problem ») (Lingner, Cooper et al. 1995). Or certaines cellules, comme les cellules souches ou les cellules cancéreuses, sont capables de se diviser perpétuellement. Elles conservent donc des télomères fonctionnels. C'est cette observation qui a conduit à la recherche et à la découverte d'un complexe ribonucléoprotéique responsable de l'allongement des télomères, la télomérase (Henson, Neumann et al. 2002). Nous allons voir ici dans un premier temps comment la structure de ce complexe lui permet d'accomplir sa fonction, puis nous verrons comment la sous-unité catalytique de ce complexe est impliqué dans le développement et le maintien des cancers et enfin nous verrons en quoi il s'agit d'une cible privilégiée pour une immunothérapie.

a. Structure et fonction de la télomérase

Identifiée pour la première fois chez un protozoaire cilié, *Tetrahymena sp.* (Greider and Blackburn 1985), on sait maintenant que la télomérase est conservée chez presque tous les organismes eucaryotes. C'est un complexe ribonucléoprotéique composé de deux sous-unités : une protéine, la telomerase reverse transcriptase ou TERT, et un ARN, le telomerase RNA (TR ou TER ou encore TERC). La sous-unité TR est une longue séquence ARN contenant un court segment qui encode la séquence complémentaire des répétitions nucléotidiques propres aux télomères (AAUCCC chez les mammifères). Ce segment d'ARN sert de modèle pour la réaction de transcription réverse dont la TERT assure la catalyse. La TERT partage de nombreuses caractéristiques des reverse transcriptases « conventionnelles » mais présente aussi des propriétés particulières au premier rang desquels figure sa capacité à ajouter de multiples répétitions nucléotidiques à l'extrémité 3' du brin d'ADN grâce à des cycles d'extension et de translocation.

L'extension progressive de l'ADN linéaire par la télomérase requiert plusieurs étapes illustrées en figure 8. Ce modèle est basé sur plusieurs études effectuées sur les télomérases de l'homme, de levures et de *Tétrahymena (Greider 1991; Collins 1999; Lue 2004)*. Dans un premier temps, l'ADN télomérique est reconnu par les deux composants de la télomérase, la sous-unité TR s'hybridant avec l'ADN par complémentarité de bases et la sous-unité TERT grâce à des motifs d'ancrages. Un segment de l'ARN TR sert alors de modèle à la TERT qui exerce alors son activité de rétro-transcription en ajoutant des nucléotides à l'extrémité 3' de l'ADN télomérique jusqu'à atteindre l'extrémité 5' du segment modèle. L'ensemble de la ribonucléoprotéine opère alors une translocation aboutissant à un repositionnement des deux sous-unités de sorte que la sous-unité TR s'hybride à nouveau avec l'extrémité 3' de l'ADN. Un nouveau groupe de nucléotides est alors ajouté comme décrit précédemment. Il résulte de cette réitération de réactions de translocation et d'addition de nucléotides, l'ajout de multiples répétitions d'une séquence caractéristique des télomères (TTAGGG chez les mammifères).

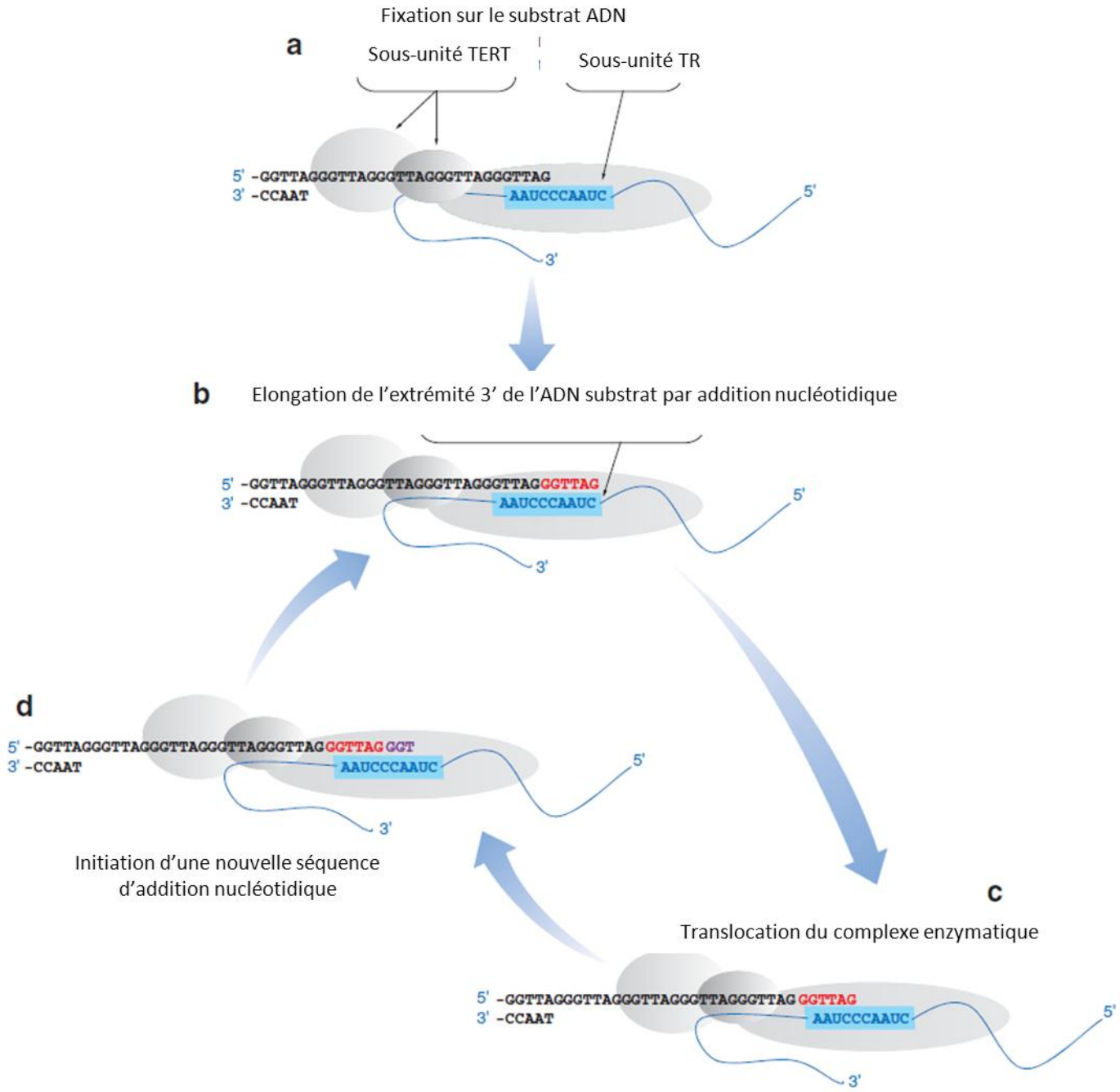

Figure 8 : Modèle d'extension progressive de l'ADN par la télomérase

L'extension de l'ADN par la télomérase requiert plusieurs étapes présentées ici. (a) L'ADN télomérique est reconnu par la nucléoprotéine constitué de la sous-unité protéique TERT et de la sous-unité ARN TR modèle (représentée en bleu). (b) La sous-unité catalytique ajoute des nucléotides à l'extrémité 3' de l'ADN jusqu'à atteindre l'extrémité 5' de l'ARN TR. (c) La télomérase dans son ensemble subit une réaction de translocation qui permet de repositionner la nucléoprotéine permettant (d) l'initiation d'un nouveau cycle d'addition nucléotidique. La répétition de ces cycles permet l'ajout de nombreuses répétitions télomériques. Ce modèle est tiré de nombreuses études sur les télomérase humaine, de levure ou de *Tetrahymena.* (Autexier and Lue 2006).

La structure primaire de la TERT comporte plusieurs sites remarquables qui lui permettent d'assurer sa fonction. En accord avec leur activité rétro-transcriptase, la région centrale de la TERT est occupée par les 7 motifs RT (1, 2, A, B', C, D et E) universellement conservés, que l'on retrouve par exemple dans la Reverse Transcriptase de HIV-1 (Lingner, Hughes et al. 1997). Ces différents domaines adoptent une structure secondaire et tertiaire que l'on décrit par analogie comme une main droite : les motifs 1,2, A et B' figurant les doigts, les motifs C et D la paume, et le motif E le pouce. Ces motifs sont clairement importants pour l'ajout de nouveaux nucléotides. Il a en effet été montré que des mutations à l'intérieur de ces sites provoquaient un mauvais appariement nucléotidique (Bosoy and Lue 2001). La TERT se distingue structurellement des autres RT par une large insertion entre les domaines A et B' qualifiée dans la littérature d' « insertion dans le domaine des doigts » ou IFD (Insertion in Fingers Domain). Ce motif propre à l'ensemble des TERT étudiées à ce jour semble impliqué également dans l'addition répétitive de nucléotides. En effet, chez la levure, une mutation spécifique de ce site conduit à une nette réduction du Km de l'enzyme (Lue, Lin et al. 2003). L'alignement des séquences des TERT avec celles des RT rétrovirales tendent à montrer que le site catalytique de la TERT fait intervenir les domaines A et B'. Ces domaines contiennent trois résidus Acide Aspartique dont la mutation abolit l'activité enzymatique de la TERT in-vitro et l'élongation des télomères in-vivo (Lingner, Hughes et al. 1997; Weinrich, Pruzan et al. 1997). Du point de vue mécanistique, on pense que l'activité enzymatique nécessite également l'intervention d' ions magnésium et manganèse se fixant sur les résidus d'acide aspartique, c'est pourquoi ce processus est décrit dans la littérature comme le mécanisme de catalyse à deux métaux (Steitz 1999). L'étude de TERT provenant de protozoaires, de champignons et de mammifères a également révélé la présence de domaines communs à ces protéines. Les segments GQ, CP, QFP et T sont situés dans la région N-Terminale d'une grande partie des TERT étudiées à ce jour. Ces motifs propres à la TERT sont nécessaires non seulement au processus d'addition répétitif de nucléotides (Lue 2005) mais également à l'interaction avec l'ARN TR (Armbruster, Banik et al. 2001). Enfin, l'extrémité C-terminale de la protéine est également d'un intérêt non-négligeable car elle est impliquée dans l'adressage de la télomérase aux nucléoles, où son activité est maximale (Yang, Chen et al. 2002).

En résumé, la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique constitué d'un ARN à fonction de modèle pour la TERT, une réverse transcriptase particulière dont la structure lui

permet d'ajouter des séries de séquences constantes à l'extrémité 3' de l'ADN télomérique. Il en résulte un maintien de la longueur des télomères.

b. La télomérase est impliqué dans la genèse et l'entretien de plusieurs tumeurs chez l'homme et l'animal

La présence de télomères fonctionnels et ayant une longueur minimale est une condition *sine qua none* pour maintenir des divisions cellulaires répétées. Dans une cellule dépourvue de mécanismes permettant de les préserver, les télomères raccourcissent après chaque division cellulaire à cause d'une réplication incomplète, de dommages causés par le stress oxydatif intracellulaire et à cause d'autres phénomènes propres aux télomères encore mal compris (Harley 1991; Shore and Bianchi 2009). A terme, l'attrition des télomères conduit à des dommages irrémédiables à l'ADN (Takai, Smogorzewska et al. 2003) entrainant un arrêt du cycle cellulaire par l'intermédiaire de la protéine p53 (Karlseder, Broccoli et al. 1999).

A la lumière de ces éléments, il apparaît qu'une cellule dont les protéines p53, Rb ou encore ATM sont inactivés, est capable de continuer de se diviser. Seulement en poursuivant ses divisions, ses télomères continuent de se raccourcir et elle atteint finalement un stade critique (Wright and Shay 1992) marqué par une instabilité génomique due à la fusion d'extrémités chromosomiques entrainant une apoptose indépendante de p53 (Weinrich, Pruzan et al. 1997). L'immortalité et la capacité à proliférer de façon perpétuelle sont des propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses. Elles doivent donc être capables de conserver des télomères d'une certaines longueurs afin de s'affranchir du stade critique qui entrainerait leur mort et l'arrêt de leur prolifération sans limite.

Bien qu'il existe au moins une autre voie de maintenance des télomères appelée allongement alternatifs des télomères ou ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) (Reddel 2003), la vaste majorité des cancers expriment la télomérase pour éviter la crise induite par les recombinaisons télomériques. En effet, chez l'homme, on estime qu'entre 85 et 90% des tumeurs présentent une activité télomérase (Kim, Piatyszek et al. 1994). Chez le chien, les travaux de l'équipe de Yazawa ont montrés que plus de 90% des tumeurs canines étudiées à ce jour présentaient une telle activité (Yazawa, Okuda et al. 1999). Comme le montre en particulier le tableau 1, cela concerne divers types tumoraux dont certains sont très

fréquents comme les lymphomes, certains types de tumeurs mammaires ou encore des tumeurs cutanées. Chez le chat la littérature est assez pauvre mais on estime, par analogie à ce qui est décrit chez le chien et chez l'homme, qu'une grande partie des cancers félins expriment la télomérase. A l'inverse des cellules tumorales, aucune activité télomérase n'est détectée chez la plupart des cellules somatiques. Seules certaines cellules souches adultes et certaines cellules à forte prolifération comme les cellules de la lignée germinale mâle montrent une telle activité (Wright, Piatyszek et al. 1996; Yazawa, Okuda et al. 1999).

Tumeur	Nombre de cas testés	Nombre de cas télomérase positifs
Tumeur mammaire mixte bénigne	24	24
Tumeur mammaire mixte maligne	9	6
Adénome mammaire	15	15
Adénocarcinome mammaire	10	10
Adénome périanal	3	3
Adénocarcinome périanal	2	2
Epithélioma sébacé	6	6
Carcinome basocellulaire	1	1
Epulis	1	1
Trichoepithelioma	1	1
Carcinome épidermoïde	1	1
Mélanome malin	1	1
Hémangiopéricytome	6	6
Hémangiosarcome	1	0
Sertolinome	1	1

Tableau 1: Activité télomérase de divers échantillons de tumeurs canines

Ces données proviennent de la compilation de trois études dont l'objectif était l'analyse d'échantillons de tumeur par test TRAP. (Yazawa, Okuda et al. 1999; Funakoshi, Nakayama et al. 2000; Yazawa, Okuda et al. 2001)

L'activité télomérase est détectée et mesurée grâce à un test basée sur la technique de la PCR, appelé Protocole d'Amplification des Répétitions Télomériques ou TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) (Kim, Piatyszek et al. 1994) (Kim and Wu 1997). Le test TRAP est très sensible et peut détecter l'activité télomérase à partir d'un large panel de taille

de prélèvement, depuis la biopsie de tissus tumoral jusqu'à seulement quelques cellules en culture. De plus les tests actuels combinant le test TRAP à la technique ELISA permettent d'obtenir une quantification de l'activité Télomérase par rapport à un standard international. Le test TRAP se décompose en trois parties illustrées en figure 14.

(A) Dans un premier temps, un court segment d'ADN est mis en contact avec un extrait protéique provenant de cellules en culture ou d'un échantillon de tissus. Si cet extrait cellulaire contient une télomérase, celle-ci catalyse l'addition de répétition télomériques (TTAGGG)n à l'extrémité du *primer* ADN. On obtient alors des fragments d'ADN de taille variable suivant l'activité télomérase.

(B) Dans un second temps, les fragments d'ADN ainsi obtenus sont amplifiés par PCR pour faciliter leur détection.

(C) La troisième étape est l'étape de détection qui peut se faire selon différents protocoles. Pour une appréciation qualitative de l'activité télomérase, une migration des amplicons sur un gel de polyacrylamide permet de mettre en évidence les différents fragments ADN dont l'extrémité a été allongée, plus ou moins selon l'activité télomérase. Pour une quantification semi-quantitative de l'activité télomérase, la révélation par ELISA est le test de choix. Dans ce cas, l'ADN primer est associée à de la biotine. Après allongement par la télomérase et amplification par PCR, les amplicons sont immobilisés sur une plaque couverte de streptavidine. L'ADN est alors dénaturé et hybridé avec des sondes complémentaires des répétitions télomériques associées à une peroxydase. L'activité télomérase est alors mesurée par colorimétrie après ajout du substrat de la peroxydase.

Présentant une fonction indispensable aux cellules cancéreuses et étant exprimés quasi-exclusivement par elles, la télomérase représente donc une cible de choix dans la lutte contre ces maladies. Nous allons donc voir maintenant quelles sont les stratégies déjà envisagées dans ce but.

c. Thérapies anti-télomérase

Nous allons nous intéresser ici aux différentes approches thérapeutiques ciblant la télomérase, qui, comme nous l'avons vu, participe à l'immortalisation des cellules tumorales dans la majorité des cas.

i. Inhibiteurs de télomérase

L'activité télomérase en elle-même étant indispensable à la majorité des cellules tumorales, des inhibiteurs de télomérase ont le potentiel d'être utilisés en tant que médicament anti-cancer spécifique stoppant la multiplication des cellules télomérase positives (Hanahan and Weinberg 2000). La sous-unité ARN TR de la télomérase est une cible de choix pour de petits oligonucléotides contenant la séquence complémentaire de cet acide nucléique. En effet un petit oligonucléotide capable de s'hybrider avec les 11 nucléotides-modèles de la sous-unité TR peut agir comme inhibiteur compétitif de la télomérase. Un tel composé appelé GRN163L ou Imetelstat a été développé (Gryaznov, Pongracz et al. 2001; Gryaznov, Jackson et al. 2007). Le GRN163L est conçu de manière à être liposoluble, donc pris en charge plus facilement par les cellules, et il cible 13 nucléotides de la TR humaine formant un complexe avec la TERT humaine. Les effets du GRN163L ont été testés sur des cellules cancéreuses *in-vitro* et sur des modèles murins xénogéniques de tumeur humaine (Dikmen, Gellert et al. 2005; Dikmen, Wright et al. 2008; Shammas, Koley et al. 2008). Ces études ont montrés que l'exposition chronique au GRN163L inhibe l'activité télomérase et cause un raccourcissement progressif des télomères. Les modèles murins de xénogreffe tumorale ont montré d'une part que ce composé était non seulement bien toléré mais qu'il avait surtout la capacité d'inhiber la croissance tumorale, de prévenir la survenue de métastases et de sensibiliser les tumeurs aux agents de chimiothérapie conventionnels (Djojosubroto, Chin et al. 2005). Le GRN163L est actuellement en essai clinique de phase II chez l'homme, seul ou en association avec d'autres agents de chimiothérapie pour le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du sein, la leucémie chronique, la thromocytose essentielle et le myélome multiple.

La limite principale des inhibiteurs de télomérase en général et de ce traitement en particulier est leur phase de latence. En provoquant un arrêt de la maintenance des télomères, les inhibiteurs de télomérase ne déclenchent pas une mort cellulaire rapide des cellules tumorales. Un certain nombre de divisions cellulaires et donc un certain temps est nécessaire

avant que les cellules tumorales atteignent le stade critique à l'origine de l'apoptose indépendante de p53. Or, pendant ce temps de latence, la masse tumorale continue d'augmenter, et on peut penser que la thérapie en sera d'autant moins efficace. D'autre part, utiliser un inhibiteur de télomérase sur une longue période pourrait avoir des effets extra-tumoraux indéterminés à ce jour, car pour rappel des cellules non-cancéreuses comme les cellules souches des tissus à fort renouvellement cellulaire expriment également la ribonucléoprotéine. A l'heure actuelle, l'utilisation de médicaments de la famille du GRN163L dans le traitement d'une tumeur en place n'est envisagée qu'en tant que traitement complémentaire d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie conventionnelle. Par contre, son utilisation chez des patients mis en rémission est envisagée afin de réduire la probabilité de récurrence du cancer en ciblant les cellules souches cancéreuses. Une cellule couche cancéreuse est défini par trois caractéristiques : (1) l'auto-renouvèlement, (2) la capacité d'initier la formation d'une tumeur et (3) elle peut générer tous les types cellulaires présents dans la tumeur (Clarke, Dick et al. 2006). De plus en plus de preuves mettent en évidence l'implication de populations de cellules souches tumorales dans l'initiation de tumeurs solides et d'hémopathies malignes (Farnie and Clarke 2006; Brennan, Wang et al. 2010), et des études récentes ont montré l'intérêt des inhibiteurs de télomérase sur ces populations cellulaires en réduisant leur taille, leur capacité de prolifération et leur capacité métastatique (Brennan, Wang et al. 2010; Marian, Cho et al. 2010).

ii. Virothérapies spécifique de la TERT

Alors que la sous-unité TR est exprimée dans l'ensemble des cellules humaines, c'est l'expression de la TERT qui est finement régulée via son promoteur (Wick, Zubov et al. 1999; Cong, Wright et al. 2002). C'est ce promoteur qui permet aux cellules cancéreuses d'exprimer la TERT en abondance à l'inverse des cellules somatiques. Un virus encodant un gène « suicide », pro-apoptotique sous le contrôle du promoteur de la télomérase aurait donc une activité cytolytique ciblant les cellules télomérase positives. Les gènes suicides évoqués dans la littérature à ce jour sont TRAIL (Katz, Spivack et al. 2003) ou la caspase 8 (Komata, Kondo et al. 2001). Une stratégie similaire envisagée est d'inclure un gène encodant une enzyme activatrice d'une toxine (Zhou, Tang et al. 2007). La pro-drogue administrée par la suite est alors métabolisée en toxine uniquement par les cellules TERT-positives et elles seules en subissent les conséquences.

Une autre approche plus étudié et basée sur le même principe utilise les capacités lytiques des adénovirus au cours de leur réplication. Les protéines E1A et E1B sont requises pour la réplication des adénovirus. Ainsi en plaçant l'expression de ces protéines sous le contrôle du promoteur de la télomérase, l'adénovirus n'est réplicatif et donc lytique qu'à l'intérieur de cellules TERT-positive (Irving, Wang et al. 2004). Des études de xénogreffe en modèle murin ont montré que cette virothérapie spécifique permettait de réduire la taille de la tumeur, de retarder sa croissance et, surtout, de prolonger la survie des souris traitées (Nakajima, Ichimaru et al. 2009). Ces résultats encourageant ont motivé l'utilisation de ce virus du nom d'OBP-301 ou Telomelysin, en essai clinique de phase I. Cette étude sur 6 patients souffrant de tumeurs solides de stades avancées a mis en évidence que l'injection intra-tumorale de Telomelysin était bien toléré quelle que soit la dose et qu'elle générait une activité anti-cancéreuse (Nemunaitis, Tong et al. 2010). Le virus OBP-301 est actuellement en essai clinique de phase II, tandis qu'une seconde génération de virus lytique incluant des gènes suicide sous le contrôle du promoteur de la TERT sont en développement (Hioki, Kagawa et al. 2008). Enfin, l'inclusion de ces virothérapies dans un schéma thérapeutique incluant chimiothérapie et/ou radiothérapie fait également l'objet de nombreuses investigations (Kondo, Tsukuda et al. 2010).

iii. Immunothérapies anti-TERT

Comme nous l'avons rappelé précédemment, c'est la TERT qui définit le spectre d'expression de la télomérase. Le fait qu'elle soit exprimée par les cellules tumorales de manière quasiment universelle tout en épargnant la grande majorité des cellules saines en fait un antigène cible particulièrement séduisant pour une immunothérapie anti-cancéreuse. Brièvement, le but de ces thérapies est de faire en sorte que le système immunitaire identifie des épitopes de la TERT comme étrangers afin qu'il produise des lymphocytes cytotoxiques capable de reconnaître et de détruire spécifiquement les cellules exprimant à leur surface les mêmes épitopes de la TERT associés à des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Liu, Chen et al. 2010).

Ces vaccins anti-TERT peuvent se présenter sous diverses formes : vaccins peptidiques, vaccins DC ou vaccins ADN.

A l'heure actuelle, près d'une trentaine de peptides de la TERT humaine ont été identifiés comme capables de promouvoir une réponse immune anti-télomérase. Certains sont des épitopes de classe I, c'est-à-dire capables de stimuler l'expansion de lymphocytes T CD8 spécifiques de la télomérase. Cette catégorie de peptide comprend notamment le peptide I540-548 capable de produire une réponse immunitaire cellulaire fonctionnelle chez des patients atteints de mélanome, de cancer de la prostate ou de cancer du sein (Vonderheide, Domchek et al. 2004; Domchek, Recio et al. 2007; Wenandy, Sorensen et al. 2008). D'autres vaccins peptides sont des épitopes de classe II capables de stimuler l'expansion de lymphocytes CD4 susceptibles de fournir des signaux appuyant la fonction effectrice. Le peptide E611-626 fait partie de cette catégorie, et présente la particularité de présenter une affinité pour de très nombreux antigènes HLA de classe II (Brunsvig, Aamdal et al. 2006). Les deux peptides cités précédemment, I540-548 et E611-626, ont été réunis dans une même présentation injectable baptisée GV1001. Ce vaccin a été testé en essai clinique de phase I/II sur des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (Brunsvig, Aamdal et al. 2006) et sur des patients atteints de carcinomes pancréatiques non-résécables (Bernhardt, Gjertsen et al. 2006). Le GV1001 est actuellement en essai clinique de phase III chez l'homme et pourrait devenir le premier vaccin anti-télomérase approuvé par la FDA.

Les vaccins DC sont encore difficiles à développer compte-tenu du caractère patient spécifique de ces traitements. Cependant un vaccin DC ciblant la télomérase est en cours de développement, le GRNVAC1. Ce vaccin utilise des cellules dendritiques isolées du sang du patient transduites *ex-vivo* avec un ARN messager encodant la quasi-totalité de la TERT humaine. Ces cellules dendritiques ainsi pulsées sont alors ré-administrées au patient (Su, Dannull et al. 2005). Les essais cliniques de phase II du GRNVAC1 sur des patients souffrants de leucémie myéloïde ou de cancer prostatique, ont montré que le vaccin était bien toléré et qu'il était capable de promouvoir une réponse immune spécifique anti-TERT.

Enfin, des vaccins ADN, dont nous détaillerons les avantages dans une autre partie, sont également en cours de développement dans le cadre des immunothérapies anti-TERT. Une étude menée dans un modèle de souris transgéniques exprimant l'antigène HLA-B7 a montré que la vaccination avec un lentivirus encodant la TERT humaine était à l'origine d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire et dotée d'une composante cytolytique spécifique (Rusakiewicz, Dosset et al. 2010). Actuellement, un vaccin ADN plasmidique encodant la TERT humaine et administré par voie intradermique conjointement à une

électroporation va entrer en essai clinique de phase I prochainement (communications personnelles).

Il est intéressant de constater que, chez le chien une équipe italienne a testé un protocole vaccinal utilisant deux types de vaccins ADN montrant des résultats prometteurs. L'équipe de Daniela Peruzzi a procédé à la vaccination de 14 chiens atteints de lymphome B en parallèle d'une chimiothérapie conventionnelle utilisant le protocole COP. Le schéma de vaccination comprenait deux injections à 14 jours d'intervalle d'un adénovirus encodant la TERT canine puis, 5 semaines plus tard d'un cycle de 5 administrations à deux semaines d'intervalle d'un plasmide encodant la TERT canine, la vaccination débutant après la phase d'induction de la chimiothérapie. Les résultats de cette étude montrent que, non seulement la vaccination est capable de promouvoir une réponse immune à médiation cellulaire, mais aussi que cette réponse apporte un bénéfice en terme de survie (figure 9) avec une différence significative des durées de survie en faveur du groupe vacciné (Peruzzi, Gavazza et al. 2010). On peut par ailleurs noter que 60% des chiens vaccinés étaient toujours vivants à la fin du suivi.

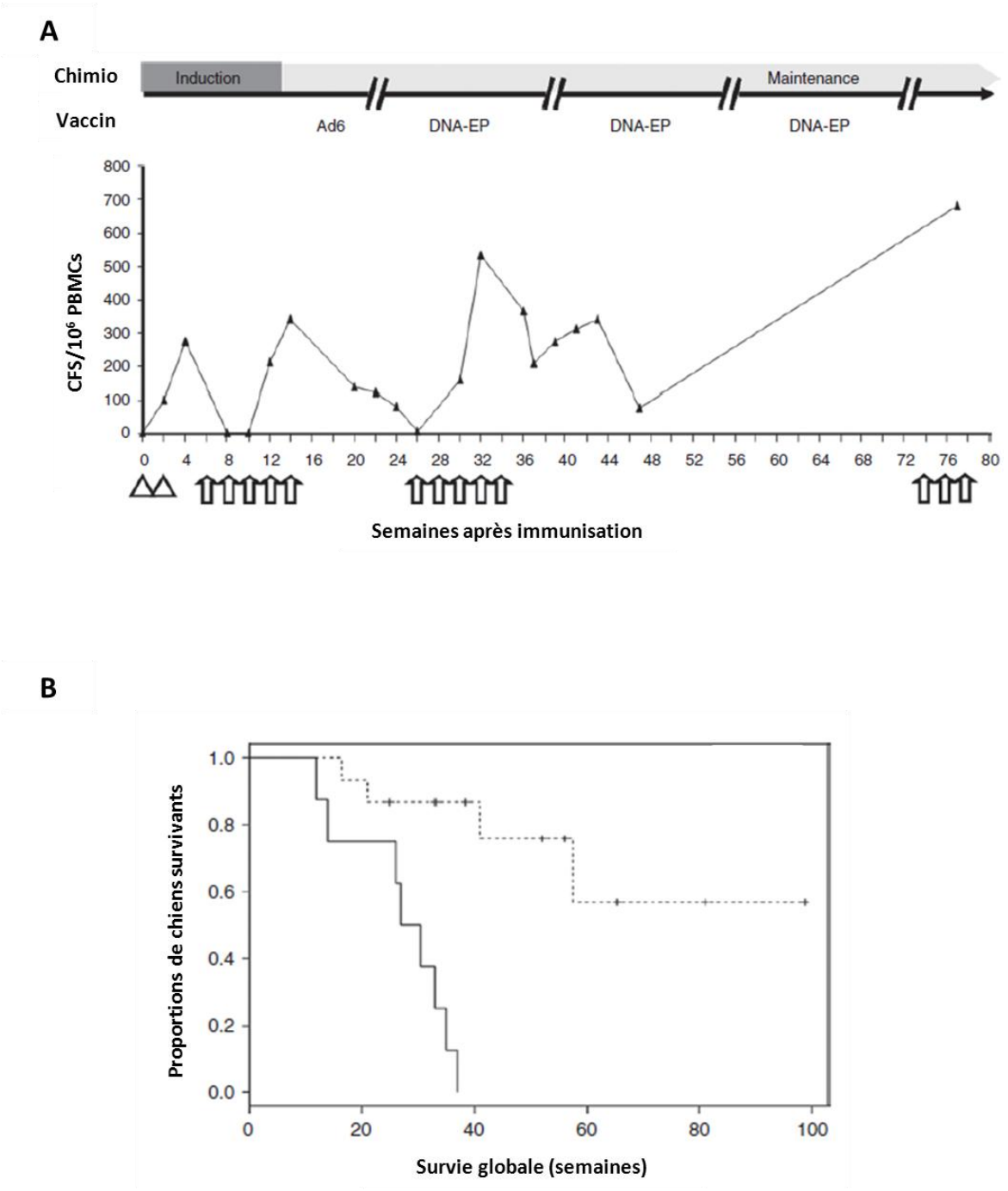

Figure 9: Efficacité d'un protocole vaccinal ciblant la télomérase chez le chien

(A) Un chien atteint d'un lymphome B immunoblastique a été traité par chimiothérapie selon le protocole COP et par immunothérapie à l'aide d'un adénovirus et d'un plasmide ADN encodant une version modifiée de la TERT canine selon le schéma thérapeutique indiqué dans la figure (triangle = injection d'Adénovirus, flèche = injection d'ADN et électroporation). La réponse immunitaire cellulaire spécifique de la TERT est mise en évidence par ELISPOT IFN-γ en utilisant des pools de peptides de la TERT. Ad6 = injection d'adénovirus ; DNA-EP = injection de plasmide suivie d'une électroporation ; PBMCs = Peripheral Blood Mononuclear Cell ; CFS = Colonie Formant Spot.

(B) Courbes de survie de Kaplan-Meier comparant la survie de chiens traités par chimiothérapie et vaccination anti-télomérase (n= 14, ligne en pointillé) à celle de chiens traités uniquement par chimiothérapie (n=8, ligne pleine). L'analyse statistique montre une différence significative en termes de durée de survie (p=0,0004). (Peruzzi, Gavazza et al. 2010)

En résumé, la télomérase est une ribonucléoprotéine indispensable à l'intégrité des télomères de la grande majorité des cellules en prolifération. De ce fait elle est d'une importance primordiale dans l'initiation et la persistance de nombreux processus tumoraux. Le spectre d'expression de sa sous-unité catalytique, la TERT, est tel que la télomérase constitue une cible de choix pour une thérapie anti-cancéreuse. Plusieurs stratégies ciblant cette ribonucléoprotéine existent, mais on peut retenir que, chez le chien, une immunothérapie anti-télomérase semble prometteuse, le point charnière de cette option thérapeutique étant de délivrer l'antigène d'intérêt dans un contexte immuno-activateur. La question du mode d'administration de cet antigène prend alors tout son sens.

IV. Les vaccins ADN

La plupart des vaccins développés jusqu'à présent sont constitués de micro-organismes tués, vivants atténués ou de sous-unités microbiennes. De ce fait, les antigènes qu'ils portent empruntent la voie exogène de présentation antigénique et permettent de stimuler une très bonne réponse anticorps mais pour la plupart, ils n'induisent pas ou peu de réponse T cytotoxique spécifique. Par conséquent, la stratégie des vaccins ADN a été pensée de manière à ce que l'antigène vaccinal emprunte la voie endogène de présentation antigénique de sorte que l'induction d'une réponse T cytotoxiques soit plus efficace qu'avec les vaccins conventionnels, tout en conservant dans la mesure du possible l'induction d'une réponse anticorps et d'une réponse T-helper.

Les vaccins ADN sont des plasmides bactériens construits dans le but d'exprimer un antigène vaccinal après administration et transfection cellulaire in-vivo. Dans cette partie nous allons nous intéresser dans un premier temps au mode de fonctionnement des vaccins ADN ainsi qu'à leurs capacités à stimuler l'ensemble des acteurs de la réponse immune. Nous verrons ensuite quels sont les méthodes disponibles pour augmenter leur efficacité, en nous focalisant plus particulièrement sur l'électroporation. Dans un troisième temps nous ferons le point sur les principaux avantages et les quelques inconvénients attribués à ces nouvelles thérapies. Et nous verrons enfin dans quel cadre les premiers vaccins ADN disponibles sont utilisés en médecine vétérinaire.

a. Fonctionnement et propriétés immunologiques des vaccins ADN

Afin de promouvoir une réponse T cytotoxique, un antigène vaccinal doit être associé à des molécules du CMH de classe I, et pour ce faire, il doit être présent dans le cytoplasme des cellules présentatrices d'antigènes. L'administration directe d'un ou plusieurs gènes suivi de la transcription et traduction de la protéine encodée, à l'intérieur de cellules présentatrices d'antigènes, semble être l'approche la plus simple et la plus étudiée (Liu 2010), bien que d'autres stratégies fassent également l'objet d'intenses investigations, telles que l'utilisation de vecteurs viraux (Robert-Guroff 2007; Cawood, Hills et al. 2012) ou bactériens (Tangney and Gahan 2010; Cronin, Stanton et al. 2012).

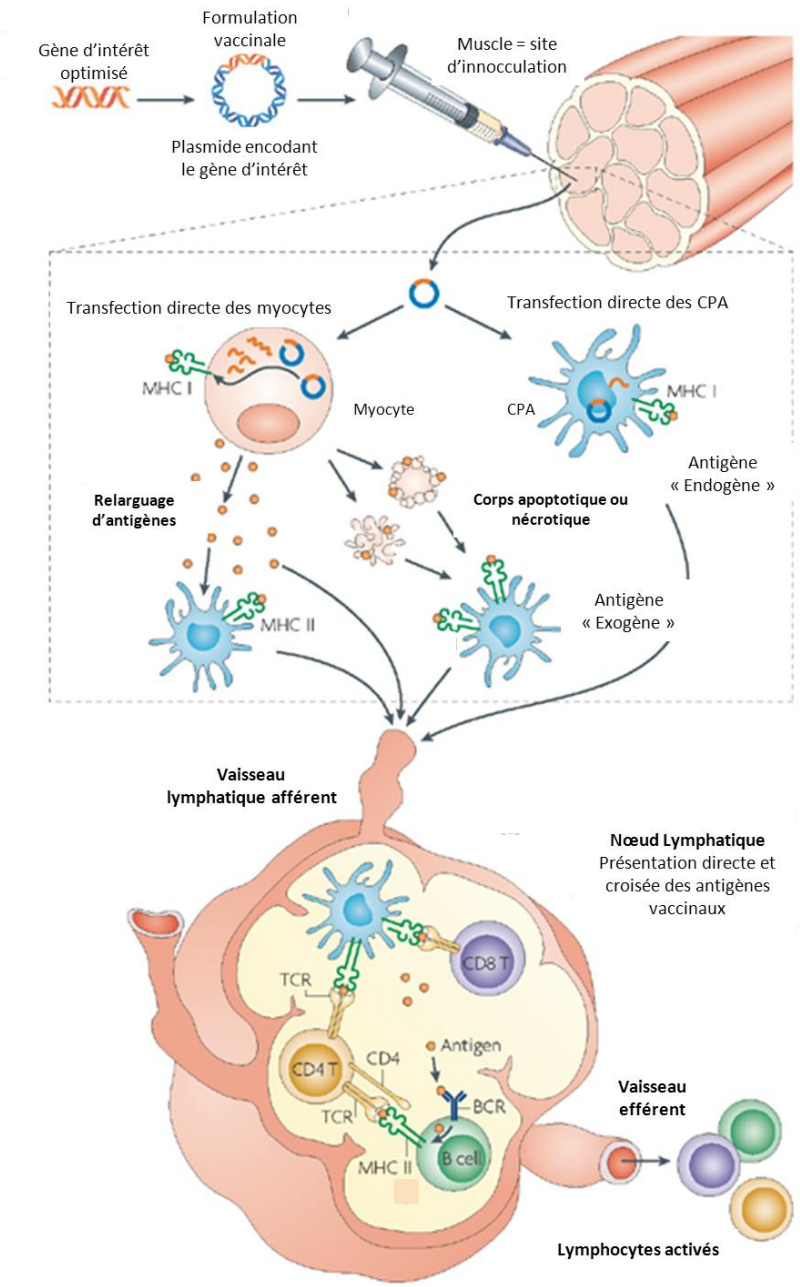

Figure 10 : Modèle de fonctionnement d'un vaccin ADN utilisé par voie intramusculaire

Les vaccins ADN sont des plasmides bactériens encodant un gène d'intérêt natif ou plus souvent modifié. Injecté par voie intramusculaire, il y a soit transfection des myocytes qui vont se comporter comme des fournisseurs d'antigènes pour les cellules présentatrices d'antigène (CPA), soit transfection directe des CPA. Les cellules présentatrices d'antigène activées migrent alors vers le nœud lymphatique drainant la région ou elles vont activer les lymphocytes T CD4 (CD4 T) et CD8 (CD8 T) via le complexe CMH (MHC I ou II) / peptide / Récepteur T (TCR). Les lymphocytes B (B cell) peuvent également être activés par fixation d'antigènes circulants sur le récepteur membranaire des lymphocytes B (BCR). Les cellules effectrices sortent ensuite du nœud lymphatique par le vaisseau efférent pour gagner le site d'action. Schéma adapté de Kutzler et Weiner (Kutzler and Weiner 2008).

Le fonctionnement des vaccins ADN découle du fonctionnement normal de la machinerie intracellulaire (figure 10). Une fois en position intracellulaire, la séquence d'ADN encodant l'antigène vaccinal est transcrite en ARN messager lui-même traduit par les ribosomes de la cellule hôte. Cette première étape nécessite que le promoteur associé au gène d'intérêt fonctionne dans les cellules de mammifère. La protéine produite se trouve alors en position intracellulaire. Elle est alors prise en charge par le protéasome qui la clive en peptides. Ces peptides sont transloqués dans le réticulum endoplasmique grâce à un transporteur membranaire hétérodimérique, le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing). Dans cet organite intracellulaire, les peptides sont associés à des antigènes du CMH de classe I ou de classe II puis exportés à la surface de la cellule transfectés. Les peptides associés au CMH de classe I favorise alors la stimulation des lymphocytes T $CD8^+$ et la réponse cytotoxique tandis que ceux associés au CMH de classe II stimulent l'expansion des lymphocytes T $CD4^+$ et la fonction helper. Enfin, lorsqu'une protéine encodée par le plasmide est sécrétée ou transmembranaire, elle est en mesure de favoriser l'apparition d'une réponse anticorps comme un vaccin peptidique classique.

Ainsi, pour que tous ces mécanismes fonctionnent, il est nécessaire que le plasmide pénètre à l'intérieur d'une cellule de l'hôte. A première vue, il parait peu probable que la simple injection de plasmide puisse aboutir à une transfection. Mais les pionniers en matière de vaccin ADN ont constaté, à leur grande surprise que l'injection intramusculaire d'un plasmide encodant des protéines de la grippe était à l'origine d'une réponse immunitaire, à la fois humorale grâce à des anticorps dirigés contre une hémagglutinine d'influenza, et cellulaire, grâce à des CTL spécifiques de la nucléoprotéine du virus (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Ce qui est plus surprenant encore, c'est d'observer une activation sensible du système immunitaire alors que les cellules ayant pris en charge le plasmide sont en grande majorité des myocytes, ce qui n'est pas observé avec des vaccins protéiques. Deux explications sont avancées pour expliquer cette observation et illustrée en figure 10 : soit un petit contingent de cellules présentatrices d'antigènes sont transfectés en même temps que les myocytes et suffisent à activer les différents bras de l'immunité (Ulmer and Otten 2000), soit les myocytes se comportent comme des usines de fabrication d'antigènes pour un transfert secondaire aux CPA qui activent les lymphocytes T via le mécanisme de présentation croisée (Ulmer, Deck et al. 1994).

A l'image du vaccin ADN de Ulmer, la plupart des vaccins ADN permettent d'activer l'ensemble des acteurs du système immunitaire et présentent des particularités immunologiques intéressantes.

Sans surprise, les vaccins ADN sont de puissants activateurs de l'immunité cellulaire. En termes d'immunité anti-infectieuse, l'activation de l'immunité à médiation cellulaire permet de cibler des antigènes cryptiques, inaccessibles aux anticorps, et dont les variations entre sous-type sont beaucoup moins fréquentes. Le vaccin ciblant les influenzavirus d'Ulmer, par exemple, induit une réponse CTL contre la nucléoprotéine de la souche de grippe influenza de H1N1 de 1938, et cette réponse est protectrice contre la souche H3N2 de 1972 utilisée pour un challenge viral (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Cette propriété est particulièrement intéressante dans la lutte contre des virus présentant de très nombreuses mutations comme le VIH. Les protéines impliquées dans la réplication intracellulaire du virus et dont les mutations sont moins fréquentes et qui sont naturellement peu immunogènes constituent de bonnes cibles thérapeutiques. Il a par exemple été montré que des CTL ont été induits *de novo* contre la protéine Nef chez des patients infectés par le VIH (Calarota, Bratt et al. 1998). En d'autres termes, le vaccin ADN induit une réponse que le virus lui-même ne provoque pas. Enfin, cette capacité d'activer l'immunité à médiation cellulaire est très intéressante dans le cadre des thérapies anti-cancéreuses. L'essentiel étant de trouver l'antigène contre lequel diriger la réponse. Chez l'homme, des vaccins ADN ciblant des antigènes tumoraux tels que l'antigène carcino-embryonnaire (Conry, Curiel et al. 2002), des antigènes du mélanome (Tagawa, Lee et al. 2003), ou des antigènes du lymphome B. Pour cette dernière affection, Stevenson et ses collaborateurs ont mis en lumière une propriété technologique intéressante de ces vaccins qui est la rapidité de leur production, puisqu'ils ont mis en place un protocole de vaccination patient-spécifique en utilisant la région variable de l'idiotype tumoral, isolé à partir de biopsies, comme antigène vaccinal (Stevenson, Zhu et al. 1995). Cette idée a d'ailleurs ouvert la voie à un nouveau concept dans lequel l'identification d'un antigène d'intérêt n'est pas obligatoire mais qu'il suffirait de cloner dans le plasmide le génome ou une partie du génome du pathogène considéré (Barry, Lai et al. 1995), ce concept étant inapproprié en cancérologie.

Une réponse T-helper est nécessaire à la production à la fois de CTLs et d'anticorps. Cette réponse a alors été rapidement mise en évidence lors des premiers essais utilisant des vaccins ADN (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Ce qui est plus intéressant est de constater que le

profil cytokinique des lymphocytes T-CD4$^+$ ainsi produits est orienté vers une réponse Th-1, car on constate la production d'IL-2 et d'IFN-γ en grande quantité (Ulmer, Donnelly et al. 1993) alors que comparativement, peu d'IL-4 est sécrétée (Feltquate, Heaney et al. 1997). En termes d'immunité anti-tumorale c'est évidemment ce qui est recherché en priorité mais cette observation est particulièrement intéressante dans les maladies comme la tuberculose, pour lesquelles un vaccin existe mais entraine parfois une réponse Th-2 délétère au patient.

Pour terminer sur les caractéristiques immunologiques des vaccins ADN, il a été montré que bien qu'ils soient conçus pour stimuler l'immunité cellulaire et la production de CTLs, les vaccins ADN avaient également la capacité de promouvoir la réponse humorale et la réponse anticorps. Ainsi comme nous l'avons vu précédemment à titre d'exemple, le vaccin ADN d'Ulmer induit la production d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine du virus grippal ciblé par le vaccin (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Cette réponse anticorps présente les mêmes caractéristiques que celle induite par les vaccins inactivés. Cependant, l'utilisation de vaccins ADN présentent plusieurs avantages qui lui sont propres. En premier lieu, la réponse anticorps qu'ils induisent n'est pas sujette à ce qui est appelée « le péché originel antigénique ». Quand un individu rencontre un antigène pour la première fois, il produit une réponse anticorps et lorsqu'il rencontre par la suite un antigène très légèrement différent du premier, il a tendance à produire une réponse anticorps vis-à-vis du premier anticorps et non dirigée contre le second. De façon assez surprenante, il a été montré, dans le cadre de vaccins antigrippaux que le vaccin ADN permettait d'obtenir une réponse anticorps spécifique de la nouvelle hémagglutinine tandis que le vaccin inactivé provoquait une réponse dirigée contre la première hémagglutinine (Donnelly, Friedman et al. 1995). D'autres avantages des vaccins ADN proviennent de leur grande fidélité quant à l'antigène vaccinal : en effet, lorsqu'un vaccin inactivé est produits après de nombreux passages sur des œufs par exemple, il arrive que des mutations se produisent et que le vaccin produit soit alors légèrement différent de celui voulu au départ ce qui a un impact sur la réponse anticorps (Katz and Webster 1989). Quant aux vaccins sous-unités, lorsqu'ils sont produits par des levures ou des cellules d'insectes, les modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations peuvent être différentes et modifier également la réponse anticorps.

b. Amélioration du potentiel des vaccins ADN

Les perspectives thérapeutiques ouvertes par les vaccins ADN ont été mises à profit à travers de nombreuses études et essais cliniques. Cependant, ces essais ont rapidement mis en évidence que la réponse immunitaire induite par ces vaccins n'était pas aussi intense qu'on ne l'avait espéré. Ceci a conduit à l'exploration d'une grande variété d'efforts destinés à augmenter l'efficacité de ces thérapies prometteuses. Ces modifications peuvent être classées en deux catégories même si elles ne sont pas indépendantes : la formulation et l'administration.

Contrairement aux virus et aux bactéries intracellulaires, les plasmides ADN ne possèdent pas de récepteurs facilitant leur internalisation. Il n'est donc pas surprenant de constater que le processus de prise en charge de l'ADN par des cellules *in-vivo* soit assez inefficace et que la plupart de l'ADN injecté en intramusculaire ne soit en fait pas transfecté (Dupuis, Denis-Mize et al. 2000). La formulation des vaccins ADN a par conséquent deux objectifs principaux : protéger les plasmides de la dégradation et augmenter leur capacité à transfecter des cellules. Les formulations testées jusqu'alors ont été utilisés pour leurs propriétés physiques comme les microparticules de 1 à 10µm de diamètre (Hartikka, Bozoukova et al. 2001; Denis-Mize, Dupuis et al. 2003) qui sont plus facilement prises en charge par les APC que le plasmide seul, ou pour leurs propriétés chimiques comme les copolymères (Caputo, Gavioli et al. 2003), les liposomes (Locher, Putnam et al. 2003), le polyéthylène-imine (Pai Kasturi, Qin et al. 2006). Le PGLA (acide polylactic-co-glycolique) est une formulation conçue afin de permettre l'administration du plasmide par voie orale (Jones, Corris et al. 1997). Les voies muqueuses sont d'ailleurs particulièrement intéressantes à la fois pour leur richesse en cellules présentatrices d'antigènes, et donc pour une immunogénicité plus importante, ainsi que pour leur facilité d'utilisation.

En lien avec l'utilisation des voies muqueuses, les modes d'administration des vaccins ADN sont l'objet d'intenses investigations. Comme nous venons de le voir, le PGLA favorise la prise en charge de plasmides administrés par voie orale. Certains vaccins ADN ont montré une efficacité en utilisant la voie transdermique par application topique sur la peau du patient (Kang, Kim et al. 2004). Des dispositifs d'injections appelés « gene-gun » permettent de propulser les plasmides ADN à travers la peau directement à l'intérieur des cellules. Les premiers « gene-guns » propulsaient les plasmides adsorbés sur de petites particules d'or et

les premières études réalisées chez la souris ont démontré leur capacité à induire une réponse immune contre une protéine encodée par un gène rapporteur (Tang, DeVit et al. 1992). Cependant seulement une faible quantité de plasmide peut être adsorbé sur les particules d'or ce qui impose une plus grande quantité d'injection. Le Biojector est un nouveau « gene-gun » qui propulse les plasmides ADN en solution saline par voie intramusculaire ou intradermique, selon la force utilisée. Il en résulte une transfection cellulaire, incluant les CPA, en une seule injection (Rao, Gomez et al. 2006).

Dans le but de favoriser l'internalisation des plasmides, une technique largement utilisée in-vitro pour permettre à l'ADN de traverser les membranes est l'électroporation. Avec le développement des vaccins ADN, des protocoles d'électroporation *in-vivo* ont été mis en place et ont montré leur efficacité chez l'animal. L'électroporation suivant l'administration d'un plasmide encodant la GHRH est actuellement utilisée en production porcine en Australie et permet une augmentation du nombre de porcelets par portée (Yamada, Sasada et al. 2012). Les principaux protocoles d'électroporation utilisés in-vivo sont constitués de deux étapes (figure 11). Dans un premier temps, un haut voltage pulsatile est administré dans la zone d'injection afin de créer des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules à transfecter. Puis dans un second temps des bas voltages pulsatiles favorisent la pénétration de l'ADN chargée négativement à l'intérieur des cellules. Ainsi en augmentant le nombre de cellules transfectées, l'électroporation augmente la réponse immunitaire dans divers modèles animaux (Tollefsen, Vordermeier et al. 2003; Chen, Fang et al. 2005). A ce mécanisme s'ajoute le fait que l'électroporation entraine un afflux de cellules inflammatoires au site d'injection ce qui favorise la prise en charge de plasmides par les cellules présentatrices d'antigène (Babiuk, Baca-Estrada et al. 2004).

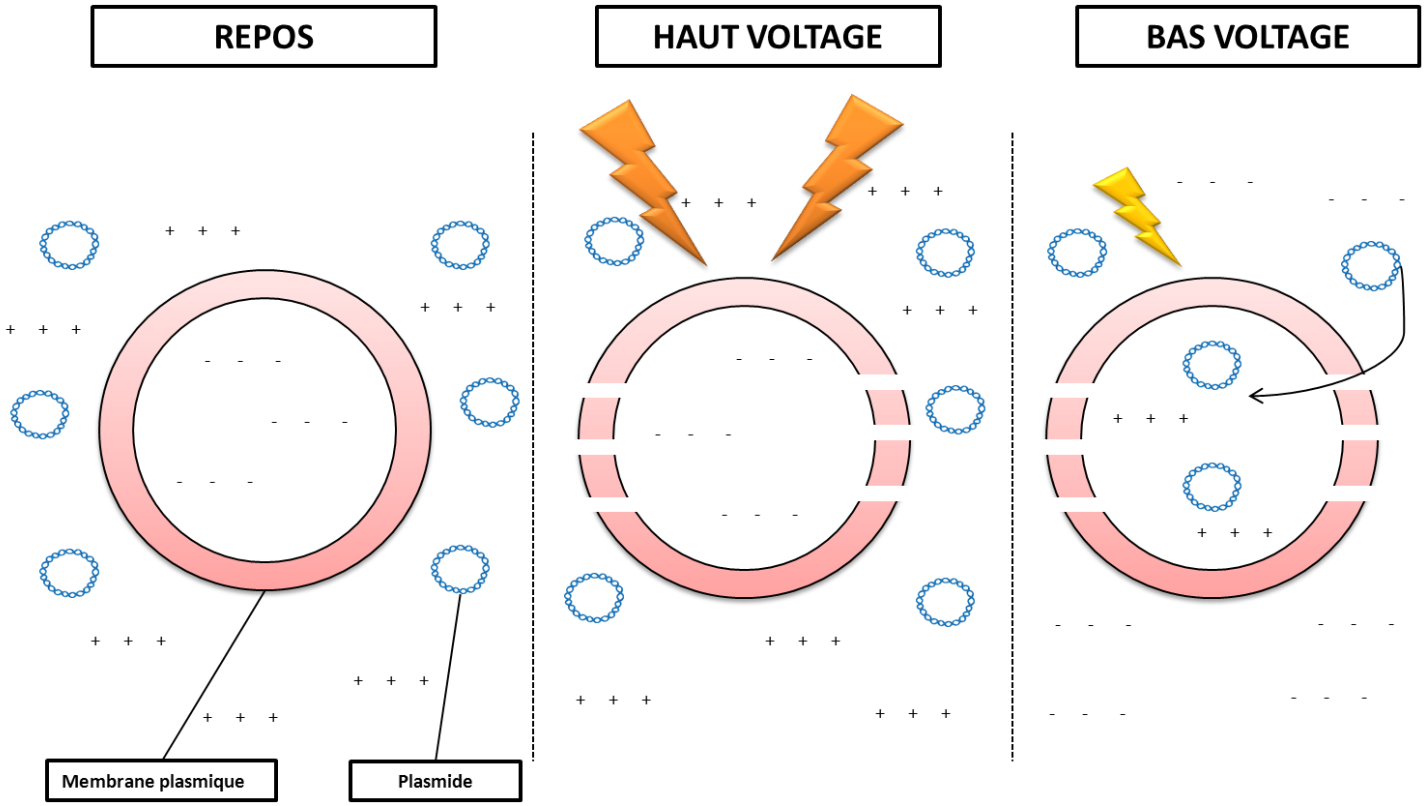

Figure 11 : Modèle de fonctionnement de l'électroporation

L'électroporation permet l'entrée des plasmides ADN en deux étapes. (1) Au repos, le milieu extracellulaire est chargé positivement, le milieu intracellulaire négativement tout comme les plasmides bactériens. La membrane plasmique est imperméable s'opposant au passage de la majorité des plasmides. (2) La cellule est soumise à un haut voltage créant des pores dans la membrane plasmique, la rendant perméable, seul la différence de charge empêche l'entrée des plasmides. (3) L'application d'un champ électrique de bas voltage permet de modifier le différentiel électrique entre le milieu intra et extracellulaire ce qui favorise l'entrée des plasmides.

Afin de rendre les vaccins ADN plus efficaces, des efforts importants sont fournis dans le but d'optimiser leur fonctionnement. Un des moyens d'augmenter le potentiel des vaccins ADN est d'augmenter l'expression d'antigène vaccinal en incluant dans la construction des promoteurs puissants (Wang, Farfan-Arribas et al. 2006) ou des facteurs de transcription d'origine virale (Egan, Megati et al. 2006). Des immunomodulateurs peuvent également être insérés dans la construction ou administrés en parallèle de la construction. Par exemple, il a été montré que l'injection de plasmides n'encodant pas la protéine d'intérêt, en même temps que les plasmides vaccins, provoque une réponse anticorps plus intense chez la souris (Sato, Roman et al. 1996). On suppose que cette action est due à l'activation des récepteurs Toll-Like 9 par les motifs CpG présents sur les plasmides (Klinman, Yamshchikov

et al. 1997). Cependant les molécules immunomodulatrices actuellement les plus étudiées sont les cytokines. Par exemple, chez la souris, le GM-CSF co-administré avec un plasmide permets une augmentation de la réponse immune spécifique de l'antigène d'intérêt (Brave, Ljungberg et al. 2005). Une autre approche explorée a été de construire un plasmide encodant à la fois l'antigène d'intérêt, ici la gp-120 du VIH, et la cytokine, dans le cas présent de l'IFN-γ (Nimal, McCormick et al. 2005). L'idée sous-jacente est de synchroniser le signal de stimulation de la réponse immune à l'expression de l'antigène. Cependant l'utilisation de ces molécules est à étudier au cas par cas. Par exemple, même si comme nous l'avons vu le GM-CSF augmente la réponse immune spécifique chez la souris, l'ajout de la cytokine à un protocole incluant une primo-vaccination et plusieurs rappels n'a pas montré de réel bénéfice (Aboud, Nilsson et al. 2010).

c. Avantages et inconvénients des vaccins ADN

Comme nous l'avons vu, les vaccins ADN présentent certains avantages et inconvénients qui leur sont propres dont nous allons discuter dans cette partie. On peut les classer en deux catégories : les caractéristiques biologiques et immunologiques, et les propriétés technologiques et industrielles. L'ensemble de ces attributs sont résumés dans le tableau 2.

i. Caractéristiques biologiques

Comme nous l'avons préalablement remarqué, les vaccins ADN présentent l'avantage de stimuler les trois versants de l'immunité acquise en étant à l'origine de réponses anticorps, T-helper, et surtout T-cytotoxique (Ulmer, Donnelly et al. 1993) ce qui les distingue de la plupart des vaccins actuellement mis sur le marché. D'autre part, l'ADN permet de diriger cette réponse contre des antigènes cryptiques qui sont naturellement peu immunogènes mais dont la fonction est essentielle pour le micro-organisme ou la cellule tumorale si bien qu'ils sont moins sujets aux mutations, comme la nucléoprotéine des influenzavirus ou la protéine Nef du VIH. Et comme nous l'avons vu, il est possible d'induire une réponse immunitaire contre un antigène donné grâce à un vaccin ADN alors que le pathogène en question ne l'induit pas (Calarota, Bratt et al. 1998). Cette caractéristique est particulièrement intéressante concernant l'immunité anti-tumorale. En effet, les cellules tumorales expriment des antigènes associés aux tumeurs mais le microenvironnement tumoral empêche la mise en place d'une

réponse vis-à-vis de ces antigènes, on peut donc espérer qu'un vaccin ADN participe à la rupture de tolérance en augmentant le contingent effecteurs dirigés contre ces néo-antigènes. L'apport des antigènes d'intérêt sous forme d'acides nucléiques permet une plus grande sécurité d'utilisation. Certains pathogènes ou leurs formes atténuées, contiennent des protéines connues pour leur effets délétères. La protéine E6 du papillomavirus humain, par exemple, est à l'origine de la transformation des cellules infectées et de leur évolution néoplasique (Sedman, Barbosa et al. 1991). D'autres ont des propriétés immunodépressives qui entravent le fonctionnement optimal du vaccin. Ainsi, l'utilisation de vaccins ADN permet de retirer ces protéines si elles sont délétères et peu immunogènes, ou de modifier leurs séquences pour qu'elles conservent leur immunogénicité tout en étant inactive.

Comme les vaccins ADN sous forme plasmidique, les vecteurs viraux, et adénoviraux en particulier, sont à l'origine d'une réponse immune cellulaire car ils apportent l'antigène vaccinal sous forme d'acide nucléique également. Ils présentent l'avantage d'être naturellement plus immunogène que les vaccins ADN car ils entrent dans leur cellule cible grâce à des récepteurs spécifiques, comme par exemple le récepteur coxsackivirus-adenovirus, qui permet non seulement la pénétration du virus dans la cellule mais entraine également une activation de la réponse à médiation cellulaire. Cependant, il est intéressant de noter que ces récepteurs ne sont pas présents sur les cellules présentatrices d'antigène (Kim, Kim et al. 2010) et on est en droit d'espérer obtenir des réponses comparables avec les vaccins ADN grâce à l'amélioration des processus comme l'électroporation ou grâce à de nouvelles formulations. Enfin, les vecteurs viraux et adénovirus présentent le gros inconvénient de provoquer une réponse immunitaire vis-à-vis du vecteur ce qui diminue grandement l'efficacité de n'importe quel vaccin utilisant le même vecteur : il a été montré que l'immunisation préalable avec un adénovirus n'encodant pas de protéines du VIH diminuait fortement la réponse immunitaire spécifique du VIH provoqué par un adénovirus encodant des protéines du VIH par rapport à une population de primates non-humain non pré-immunisés (Casimiro, Chen et al. 2003). Bien entendu, de nombreux efforts sont mis en œuvre afin de rendre les vecteurs viraux plus efficaces en leur permettant notamment de se fixer sur les cellules présentatrices d'antigène (Kim, Kim et al. 2010).

Un dernier avantage concernant les propriétés biologiques des vaccins ADN est la possibilité de les administrer par voie muqueuse ou orale. Comme nous l'avons vu précédemment, de nouvelles formulations sont mises au point afin de protéger les plasmides

contre la dégradation et faciliter la transfection cellulaire in-situ. L'utilisation des voies muqueuses présentent un double avantage : d'une part elle permet de délivrer le plasmide dans un environnement riche en cellules présentatrices d'antigènes et donc augmente l'immunogénicité du vaccin, et d'autre part ces voies sont pratiques d'utilisation et peu ou pas traumatisantes (comprimés, gélules, patchs percutanés, pommades,…) ce qui favorise l'observance des traitements.

Si les caractéristiques biologiques et immunologiques des vaccins ADN sont intéressantes, c'est surtout leurs caractéristiques technologiques qui intéressent les industriels du médicament ainsi que organismes de santé publique.

ii. Caractéristiques technologiques

La technologie des vaccins ADN se distingue par plusieurs attributs particulièrement intéressants pour l'industrie pharmaceutique et les professionnels de santé.

En premier lieu, la production des vaccins ADN est rapide. Même si cela n'est pas d'importance capitale en cancérologie, cette caractéristique est essentielle dans la mise en place de plan de lutte contre les pandémies où la vaccination en masse de populations nécessite une très grande quantité de vaccin. La possibilité de produire la quantité suffisante de vaccin en un temps très court permet d'une part, une meilleure gestion des stocks, et d'autre part de fournir un vaccin le plus adapté au pathogène responsable de la pandémie. De plus la synthèse des plasmides ne pose pas de gros problème de biosécurité car on ne travaille pas avec des organismes pathogènes mais seulement avec leur ADN. Ainsi, cela facilite grandement le travail et la sécurité des techniciens chargés de la production et cela n'impose pas un cadre de production à très haut niveau de risque biologique. Concernant toujours la production de ces plasmides, on peut noter que celle-ci est standardisée et assez simple comparativement à la production de virus atténués par exemple. Ceci garantit une plus grande homogénéité des lots de vaccin, cependant on sait que des mutations apparaissent lors de la réplication de l'ADN donc certaines vérifications doivent quand même être effectuées pour garantir la conformité de la séquence de l'antigène vaccinal.

En plus d'être facile et rapide à produire, les vaccins ADN sont faciles à utiliser au quotidien. En effet, contrairement aux vaccins vivants classiques ou aux vecteurs viraux qui doivent être stockés à basse température, les vaccins ADN sont stables à température

ambiante. Cette propriété est particulièrement intéressante pour la vaccination de populations n'ayant pas accès rapidement à des structures médicales possédant le matériel nécessaire au maintien de la chaine du froid. De plus, comme nous l'avons vu plus haut, le développement de nouvelles formulations permettent d'espérer un emploi par voie orale ou muqueuse, ce qui rend leur utilisation au quotidien moins désagréable que par voie injectable.

Enfin, un argument souvent avancé en faveur de cette nouvelle stratégie vaccinal est son faible coût, cependant cet argument est à nuancer. En termes de coût de production, il est clair que les vaccins ADN sont avantageux. Mais l'utilisation de moyens complémentaires comme l'électroporation ou l'utilisation d'un « gene-gun » pour augmenter l'efficacité de la thérapie, nécessite un matériel coûteux voire très coûteux qui augmente considérablement le prix final de la thérapie. De plus, comme nous en avons déjà discuté précédemment, la plus faible immunogénicité des vaccins ADN impose des rappels plus fréquents ce qui concourt également à l'augmentation du coût final du traitement.

En définitive, malgré quelques inconvénients notables, les vaccins ADN présentent un grand nombre de qualités qui en font de très bons candidats pour les immunothérapies de demain. Il n'est donc pas étonnant que de nombreux projets utilisent cette technologie dans le but de traiter divers affections et, comme nous allons le voir maintenant, c'est dans le domaine vétérinaire que les premiers vaccins ADN ont été mis sur le marché.

	Biologiques	Technologiques
Avantages	• Stimule les trois versants de l'immunité innée : - Réponse T cytotoxique - Réponse anticorps - Réponse T « helper » • Stimule l'immunité innée • Evite les effets délétères de certaines protéines - Immunodépression - Transformation cellulaire • Induit une réponse immune non induite par la maladie naturelle • Peut générer une réponse immune à l'encontre d'antigènes cryptiques • Administration par voie muqueuse possible • Possibilité d'obtenir une réponse Th2-like grâce à certains gene-guns.	• Sécurité de production : pas nécessité de travailler avec le pathogène • Modification facile de la séquence : addition de cytokine, etc… • Rapidité de production • Stable à température ambiante • Coût de production faible • Stabilité de la séquence au cours de la production • Pas de problème de modification post-traductionnelle
Inconvénients	• Peu immunogène	• Nécessite l'utilisation de technologies additionnelles potentiellement coûteuse pour augmenter leur immunogénicité

Tableau 2: Principaux attributs des vaccins ADN

d. Plasmides ADN disponibles en santé animale

A l'heure actuelle, trois plasmides ADN ont reçu une autorisation de mise sur le marché pour un usage en médecine vétérinaire et un quatrième est disponible en production animale (table 3).

Bien que chronologiquement, il s'agisse du troisième plasmide ADN commercialisé chez l'animal, le LifeTide® n'est pas à classer parmi les vaccins ADN mais parmi les thérapies géniques au sens large. En effet, son but n'est pas de provoquer une réponse immune mais de tirer profit directement de l'effet du produit d'expression du plasmide, la GHRH. Commercialisé en Australie depuis 2008 en production porcine, on a montré que l'injection de ce plasmide chez des truies entraine une augmentation du poids moyen des porcelets ainsi que des portées plus importantes en augmentant la quantité d'hormone de croissance (GH) au cours de la gestation (Person, Bodles-Brakhop et al. 2008; Khan, Bodles-Brakhop et al. 2010). Ce plasmide est administré par injection intramusculaire suivie d'une électroporation, ce qui est particulièrement intéressant car cela montre pour la première fois que l'électroporation est utilisable chez le gros animal.

Le premier vaccin ADN mis sur le marché en 2005, concerne la filière équine et encode les protéines E et prM du virus West Nile. Chez le cheval, l'infection par le virus West Nile est souvent inapparente mais peut entrainer un simple syndrome grippal ou une encéphalomyélite à fort taux de mortalité. Il a été montré, d'abord chez la souris, puis chez le cheval, que l'utilisation de ce vaccin permettait d'obtenir une protection vis-à-vis d'un challenge viral, essentiellement grâce à la production d'anticorps neutralisants (Davis, Chang et al. 2001). L'immunité à médiation cellulaire n'a pas été explorée dans cette étude dont l'objectif était de montrer l'effet protecteur du vaccin. Des études ultérieures ont par ailleurs montré que ce vaccin était également efficace chez les oiseaux, qui sont les principaux réservoirs de virus (Kilpatrick, Dupuis et al. 2010), et qu'il était à l'origine d'une réponse anticorps chez l'homme qui peut également être infecté par ce virus (Martin, Pierson et al. 2007).

Quelques jours après la mise sur le marché du vaccin West Nile, un second plasmide ADN a été approuvé pour la prévention de l'infection des salmonidés par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse. Ce plasmide encode les protéines N, P, M, NV et G du

rhabdovirus et la vaccination a permis d'obtenir une protection vis-à-vis d'un challenge viral (Corbeil, Lapatra et al. 1999). La vaccination est ici aussi à l'origine d'une réponse anticorps (Corbeil, Lapatra et al. 1999), mais il semble que la protection soit également le fait de l'immunité innée, car il a été montré qu'elle était à l'origine d'une régulation positive des gènes impliqués dans la réponse à l'interféron de type I, intervenants dans la réponse antivirale précoce (Purcell, Nichols et al. 2006).

Enfin, le dernier plasmide ADN en date à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché nous intéresse plus particulièrement car il touche au domaine de la cancérologie vétérinaire. Ce vaccin ADN encode la tyrosinase humaine et a été mis sur le marché pour le traitement du mélanome canin (Bergman, McKnight et al. 2003; Bergman, Camps-Palau et al. 2006; Grosenbaugh, Leard et al. 2011). Comme nous l'avons évoqué précédemment, il semble que ce soit la xénogénicité de la tyrosinase qui soit à l'origine de la rupture de tolérance vis-à-vis de la protéine canine. Ce vaccin a montré son efficacité en termes de survie puisque la médiane de survie des chiens atteints de mélanome de la cavité oral de stade II à IV traité est de 389 jours (Bergman, McKnight et al. 2003) alors que les chiens traités par chirurgie seule ont une médiane de survie de 90 (stade IV) à 150 jours (stade III) (Harvey, MacEwen et al. 1981) ce qui représente une durée de survie comparable à celle obtenues avec une chimiothérapie conventionnelle au carboplatine (Brockley, Cooper et al. 2013). Son mécanisme d'action est encore flou, on a montré qu'il était à l'origine d'une réponse anticorps (Liao, Gregor et al. 2006) mais là encore on peut regretter que le versant cellulaire de la réponse immunitaire n'ait été exploré. Le vaccin, commercialisé par Merial sous la dénomination Oncept® peut être administré par voie intramusculaire ou intradermique grâce au gene-gun Biojector. Malheureusement, il ne dispose d'une autorisation de mise sur le marché qu'aux Etats-Unis.

Nom	Indication	Espèce	Année	Gène(s) encodés
West-Nile-Innovator® (Fort Dodge AH, Fort Dodge, USA)	Infection par le virus West-Nile	Cheval	2005	Protéines E et PrM
Apex-IHN® (Novartis AH, Bâles, Suisse)	Nécrose hématopoïétique infectieuse des salmonidés	Salmonidés	2008	Protéines N, P, M, NV et G
Life Tide®SW5 (VGX™ AH Inc., The Woodlands, USA	Augmentation de la taille des portées	Truie en gestation	2008	GHRH
Oncept® (Merial, Lyon, France)	Mélanome	Chien	2010	Tyrosinase humaine

Tableau 3: Plasmides mis sur le marché pour une utilisation chez l'animal

En définitive, nous constatons qu'en ce qui concerne les vaccins ADN, la médecine vétérinaire, et le milieu de la santé animale au sens large, sont des précurseurs. On peut cependant regretter que pour aucun des trois vaccins dont nous venons de parler, l'implication de l'immunité cellulaire n'ait été clairement mise en évidence. En cancérologie vétérinaire, la mise au point de nouvelles thérapies profitera bien évidemment aux animaux mais pourra également être le point de départ de nouveaux essais chez l'homme, car bon nombre de tumeurs humaines et animales présentent des caractéristiques macroscopiques et microscopiques communes.

V. Conclusion partielle

Au terme de cette étude bibliographique, il ressort que la progression des connaissances de l'immunologie des tumeurs a rendu possible la mise au point de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques. La TERT, du fait de son spectre d'expression presque restreint aux cellules cancéreuses chez l'animal, en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour une immunothérapie. Combiné à la spécificité d'action des lymphocytes T cytotoxiques, l'idée de développer un vaccin utilisant la TERT comme antigène vaccinal semble séduisante. Enfin, la grande souplesse et les nombreuses possibilités permises par les vaccins ADN pourraient participer à une plus grande efficacité de cette nouvelle thérapie anti-tumorale. Nous allons donc voir maintenant que trois nouveaux plasmides encodant des TERT animales présentent une fonctionnalité et une innocuité satisfaisante *in-vitro*, qu'elles sont immunogènes *in-vivo* en modèle murin et qu'il existe, chez le chien sain, une population de lymphocytes sécréteurs d'IFN-γ spécifiques d'épitopes de la TERT canine attestant de la pertinence d'une future utilisation du plasmide encodant cette protéine.

Partie 2 :

Etude expérimentale

Partie 2: Etude Expérimentale

I. Matériel, méthodes et animaux

a. Souris

Tous les animaux ont été manipulés selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et conformément aux recommandations du comité d'éthique en expérimentation animale de l'institut Pasteur de Paris. Les souris femelles Balb/cBy et C57BL/6j de 6 à 8 semaines d'âge utilisées dans l'étude ont été fournies par les laboratoires Janvier (Saint-Berthevin, France). Les animaux étaient hébergés dans une animalerie Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiés de l'institut Pasteur de Paris (Animalerie sida et rétrovirus – Lwoff n°22, numéro d'agrément B 75 15-07). Avant d'être immunisées par voie intradermique (ID) ou intramusculaire (IM), les souris ont été anesthésiées avec un mélange de 2% de xylazine (Rompun, Bayer Santé, Loos, France) et de 8% de Kétamine (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) préparé dans un tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline 1X, Life technologies SAS, Saint-Aubin, France). L'agent anesthésique était administré par voie intrapéritonéale en quantité variable selon le poids de chaque animal et selon la durée de l'anesthésie souhaitée.

b. Plasmides

Les trois constructions sont construites de la même manière. La séquence d'ADN encodant la Télomérase Reverse Transcriptase (TERT) est précédée de la séquence nucléotidique de l'ubiquitine humaine (cette séquence étant commune à tous les mammifères) afin de faciliter l'adressage de la protéine au protéasome et augmenter sa prise en charge par l'immunoprotéasome (Wang, Sun et al. 2004). La séquence de la TERT est suivie de celle du peptide V5 des influenzavirus afin de faciliter la détection de la protéine fusion par immunohistochimie ou par Western-blot. La séquence du gène de la TERT a été modifiée de manière à ce que la protéine soit inactive et non transportée dans le noyau.

Toutes les séquences d'ADN ont été fournies par Genecust (Dudelange, Luxembourg) puis clonées dans le plasmide d'expression pCDNA3.1 de Life technologies SAS (Saint-Aubin, France). Les trois plasmides ont été conçus à Invectys puis envoyés à R&D Biotech

(Besançon, France) pour être synthétisé selon les bonnes pratiques de laboratoire. La constitution des plasmides est schématisée en figure 12.

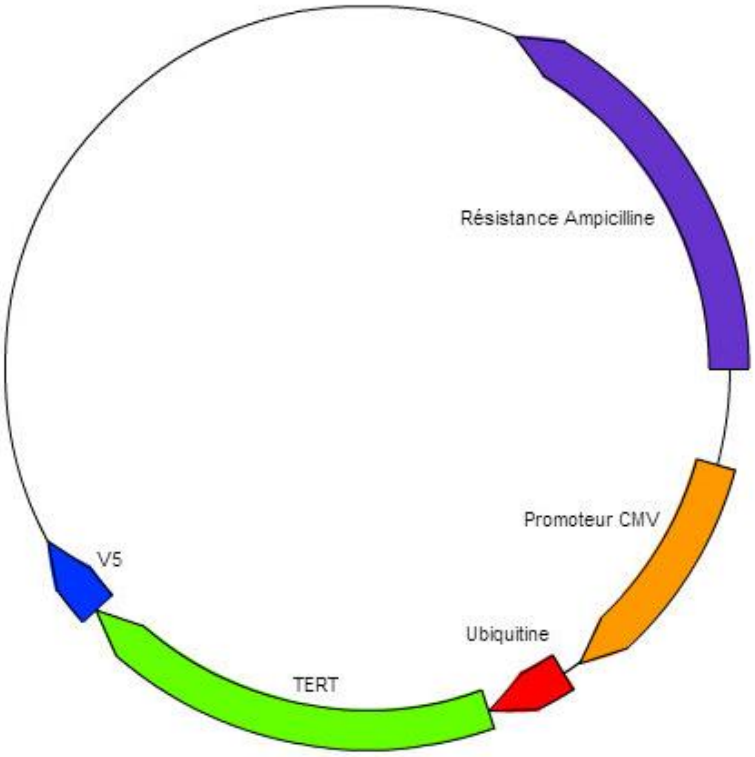

Figure 12: Représentation schématique des plasmides utilisés dans l'étude :

Tous les plasmides utilisés encodent l'une des TERT animales, celle du chien pour pDUV5, celle du chat pour pUF2 et une télomérase hybride chien/chat pour pCDT. Les séquences nucléotidiques ont été modifiées afin d'inhiber l'activité enzymatique de la protéine et sa translocation dans les nucléoles. Ce double verrou garantit l'innocuité de la protéine. Dans toutes les constructions, la séquence de la TERT est précédée par celle de l'ubiquitine humaine et suivie par celle du peptide V5 de la grippe afin de faciliter respectivement l'adressage de la protéine au protéasome et la détection de la protéine.

Le plasmide pDUV5 encode l'intégralité de la télomérase canine, pUF2 encodes 96% de la séquence totale de la TERT féline et pCDT encode une télomérase hybride entre la TERT féline et la TERT canine. Les plasmides étaient stockés à -20°C, dans du PBS 1X, à une concentration de 2mg/mL. Le plasmide pCDNA 3.1 vide a été utilisé comme vecteur contrôle pour les expériences de Western Blot ou de Trap-assay.

c. Peptides utilisés pour les études en modèle murin

Les peptides des différentes TERT utilisées pour les études sur souris ont été choisis par prédiction épitopique *in-silico* afin qu'ils se fixent au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I murin H2-D^b (C57-BL/6), ou au CMH de classe II H2-IA^d (Balb/c). Quatre algorithmes disponibles en ligne ont été utilisés pour sélectionner les peptides ayant les meilleurs scores de fixation : Syfpeithi (http://www.syfpeithi.de/), Bimas (http://www-bimas.cit.nih.gov/), NetMHCpan et SMM (http://tools.immuneepitope.org/main/). Tous ces peptides ont été synthétisés et fournis sous forme lyophilisée avec une pureté supérieure à 90% par l'entreprise Proimmune (Oxford, Grande Bretagne). Avant toute utilisation, les peptides lyophilisés étaient dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 2mg/mL, et stockés sous forme d'aliquots de 35µL à -20°C. Les séquences et la restriction H2 de chaque peptide sont détaillées dans la table 4.

Peptide	Séquence	H2 (Classe – Lignée murine)
580	RQLFNSVHL	H2-Db (Classe I - C57-BL/6)
621	RPIVNMDYI	
987	TVYMNVYKI	
1105	RCLLGPLRAAKAHLS	H2-Iad (Classe II - Balb/c)
1106	CLLGPLRAAKAHLSR	
1109	GPLRAAKAHLSRQLP	
951	YSSYAQTSIRSSLTF	

Tableau 4 : Séquences des peptides restreints H2 déterminées *in silico*

Les peptides restreints à H2-D^b et H2-Ia^d ont été sélectionnés *in silico* grâce à des algorithmes de prédiction épitopique dans le but de détecter respectivement les cellules T CD8 et CD4, spécifiques des TERT canines félines ou hybrides, en modèle murin.

d. Peptides de la TERT canine

Les peptides de la TERT du chien utilisés pour les essais d'immunisation *in vitro* ont été fournis sous forme lyophilisée par l'entreprise JPT Peptide Technologies (Berlin, Allemagne) Ils ont ensuite été remis en suspension dans du diméthyl-sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich chimie SARL, Saint-Quentin Fallavier, France) à une concentration finale de 2 mg/mL. Nous n'avons utilisé qu'un tiers de la séquence totale de la TERT canine pour synthétiser les peptides, cette portion est illustrée dans la figure 13. Cette séquence a été utilisée pour synthétiser 4 groupes de peptides de 15 acides aminés se recouvrant de 11 résidus.

A) TERT canine 1023 AA

```
   1 MPRAPRCRAV RALLRGRYRE VLPLATFLRR LGPPGRLLVR RGDPAAFRAL VAQCLVCVPW
  61 GARPPPAAPC FRQVSCLKEL VARVVQRLCE RGARNVLAFG FALLDGARGG PPVAFTTSVR
 121 SYLPNTVTET LRGSGAWGLL LRRVGDDVLT HLLARCALYL LVAPSCAYQV CGPPLYDLCA
 181 PASLPLPAPG LPGLPGLPGL GAGAGASADL RPTRQAQNSG ARRRRGSPGS GVPLAKRPRR
 241 SVASEPERGA HRSFPRAQQP PVSEAPAVTP AVAASPAASW EGGPPGTRPT TPAWHPYPGP
 301 QGVPHDPAHP ETKRFLYCSG GRERLRPSFL LSALPPTLSG ARKLVETIFL GSAPQKPGAA
 361 RRMRRLPARY WRMRPLFQEL LGNHARCPYR ALLRTHCPLR AMAAKEGSGN QAHRGVGICP
 421 LERPVAAPQE QTDSTRLVQL LRQHSSPWQV YAFLRACLCW LVPTGLWGSR HNQRRFLRNV
 481 KKFISLGKHA KLSLQELTWK MKVRDCTWLH GNPGACCVPA AEHRRREEIL ARFLVLVDGH
 541 IYVVKLLRSF FYVTETTFQK NRLFFYRKSV WSQLQSIGIR QLFNSVHLRE LSEAEVRRHR
 601 EARPALLTSR LRFLPKPSGL RPIVNMDYIM GARTFHRDKK VQHLTSQLKT LFSVLNYERA
 661 RRPSLLGASM LGMDDIHRAW RTFVLRIRAQ NPAPQLYFVK VDVTGAYDAL PQDRLVEVIA
 721 NVIRPQESTY CVRHYAVVQR TARGHVRKAF KRHVSTFADL QPYMRQFVER LQETSLLRDA
 781 VVIEQSSSLN EAGSSLFHLF LRLVHNHVVR IGGKSYIQCQ GVPQGSILST LLCSLCYGDM
 841 ERRLFPGIEQ DGVLLRLVDD FLLVTPHLTQ AQAFLRTLVK GVPEYGCRAN LQKTAVNFPV
 901 EDGALGSAAP LQLPAHCLFP WCGLLLDTRT LEVSCDYSSY AHTSIRASLT FSQGAKPGRN
 961 MRRKLLAVLR LKCCALFLDL QVNGIHTVYM NVYKIFLLQA YRFHACVLQL PFNQPVRKNP
1021 SFFLRVIADT ASCCYSLLKA RNAGLSLGAK GASGLFPSEA ARWLCLHAFL LKLAHHSGTY
1081 RCLLGALQAA KAHLSRQLPR GTLAALEAAA DPSLTADFKT ILD
```

B)

POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 4
1	19	36	53
2	20	37	54
3	21	38	55
4	22	39	56
5	23	40	57
6	24	41	58
7	25	42	59
8	26	43	60
9	27	44	61
10	28	45	62
11	29	46	63
12	30	47	64
13	31	48	65
14	32	49	66
15	33	50	67
16	34	51	68
17	35	52	69
18			70

Figure 13 : Pools de peptides issus de la TERT canine

A) Séquence protéique de la TERT canine. La région utilisée pour l'étude d'immunisation *in vitro* et la révélation par ELISPOT est représentée en gris, elle a été divisée en 15mer se recouvrant de 11 acides aminés. B) Répartition des différents peptides en 4 pool pour l'étude d'immunisation in-vitro et pour la révélation par ELISPOT.

e. Produits sanguins canins

Les échantillons de sang et de sérum canins ont été fournis par l'institut Bourgelat (Marcy l'Etoile, France). Ils ont été prélevés sur un chien sain de 4 ans de race beagle nourri, logé et traité conformément aux recommandations du comité d'éthique du campus vétérinaire de VetAgroSup. Les échantillons de sang héparinés ont été dilués au quart dans du PBS 1X (Life technologies SAS, Saint-Aubin, France) puis délicatement déposés, volume à volume, sur un milieu de séparation des lymphocytes (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, Courtaboeuf, France). L'ensemble était alors centrifugé pendant 30 minutes à température ambiante, à une vitesse de 2200 tours par minute sans freinage. Les cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) ont alors été prélevées et conservées, avant utilisation, dans du sérum de veau fœtal (SVF, PAA Laboratories GmbH, Pashing, Autriche) contenant 10% de DMSO (Sigma Aldrich chimie SARL, Saint-Quentin Fallavier, France) à -196°C dans de l'azote liquide. Les échantillons de sérums canins ont été stockés dans des tubes secs, à -20°C avant utilisation.

f. Cultures cellulaires

Les cellules CRFK et HEK 293T utilisées pour les tests de transfection ont été gracieusement fournies le Pr Simon WAIN-HOBSON (Institut Pasteur). Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de SVF inactivé thermiquement, 1% de sodium-pyruvate, 1% de pénicilline-streptomycine (concentrations finales de 100U/mL de pénicilline et 100µg de streptomycine/mL) et 0,1% de β-mercaptoéthanol, dans une atmosphère à 37°C contenant 5% de CO2. Tous les composants du milieu de culture ont été fournis par l'entreprise Life technologies SAS (Saint-Aubin, France).

g. Transfection cellulaire

Les cellules CRFK et HEK 293 T ont été transfectées avec les plasmides pDUV5, pCDT ou pUF2 en utilisant le kit de transfection JetPRIME® (Polyplus-transfection SA, Illkirch, France) selon les instructions du fabricant. Avant la transfection, 400 000 cellules HeLa ou 700 000 cellules 293 T ont été cultivées pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO_2 dans des plaques 6 puits dans 2mL de milieu de culture DMEM complémenté comme indiqué ci-

dessus. Dans chaque puits, 2µg de chaque plasmide dilué dans 200µL de tampon jetPRIME® (ou seulement 200µL de tampon jetPRIME® pour les puits témoins) ont alors été ajoutés aux cellules en culture. Quatre heures plus tard, le milieu de transfection a été remplacé par du DMEM complémenté frais. Les cellules ont ensuite été replacées à 37°C, 5% de CO_2 pendant 24 heures avant d'être analysées.

h. Western blots

Les cellules HEK 293T préalablement transfectées ont d'abord été lysées sur glace dans un tampon de lyse pour essai de radioimmunoprecipitation (RIPA Buffer, Sigma Aldrich chimie SARL, Saint-Quentin Fallavier, France) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche Diagnostic, Indianapolis, USA) pendant 20 minutes. La suspension ainsi obtenue a alors été centrifugée 15 minutes à 1400 tours par minute à 4°C afin de pouvoir séparer les protéines contenues dans le surnageant, des débris cellulaires. Le surnageant a donc été prélevé et la concentration protéique a été dosée selon la méthode de Bradford afin de normaliser la quantité d'échantillons sur le gel. Les extraits protéiques ont ensuite été dénaturés pendant 5 minutes à 95°C, puis séparés sur gel Nu-PAGE® Novex Bis-Tris 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, USA) et enfin transférés sur membrane PVDF fourni avec le dispositif de transfert iBlot® (iBlot® transfer stack, Invitrogen, Carlsbad, USA). La membrane a alors été mise en contact avec un anticorps anti-V5 couplé à la peroxydase HRP (Invitrogen, Carlsbad, USA).Le signal a enfin été analysé en mettant en contact la membrane avec des films radiographiques de 18 x 24 cm dans la cassette correspondante fournie par l'entreprise GE healthcare (Buckinghamshire, Grande Bretagne).

i. Immunofluorescence et microscopie

Le jour précédant la transfection, 20.10^3 cellules 293T ont été placées en culture dans des plaques de microscopie à 8 chambres (8-wells Lab-Tek® chamber slide, Sigma Aldrich chimie SARL, Saint-Quentin Fallavier, France) dans 200µL de milieu de culture DMEM complémenté, à 37°C et à 5% de CO_2. Le lendemain, après avoir remplacé le milieu de culture, un mélange contenant 1µg d'ADN à transfecter, 50µL de milieu de transfection OptiMEM (Life technologies SAS, Saint-Aubin, France) et 2,5µL de FugeneHD (Promega France, Charbonnières-les-bains, France) a d'abord été incubé 30 minutes à température ambiante, puis 10 µL de ce mélange a été ajouté dans les chambres de culture correspondante.

Des chambres contrôles ont été préparées en y ajoutant le même mélange mais sans ADN. Les lames à 8 chambres ont alors été laissées en incubateur pendant 24 heures puis, les cellules 293T ainsi transfectées ont été lavées délicatement avec du PBS 1X et 200µL de PFA 2% a été ajouté dans chaque chambre pendant 10 minutes à +4°C afin de fixer et de perméabiliser les cellules. Après avoir été lavées avec du PBS 1X 0,05% Tween®20 et après une incubation 30 minutes à température ambiante, une solution de blocage (0.5% TritonX100; 3% BSA; 10% sérum de chèvre) a été ajoutée. Les cellules 293T ont alors été mises en contact avec un anticorps primaire de souris anti-V5 (Life technologies SAS, Saint-Aubin, France) dilué à 1/200 dans la solution de blocage pendant 1h30 à température ambiante avec une légère agitation. Elles ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X 0,05% Tween®20, puis un anticorps secondaire anti-souris conjugué au fluorochrome FITC (Sigma Aldrich chimie SARL, Saint-Quentin Fallavier, France) a été ajouté dans les chambres pendant 45 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules ont alors été lavées 4 fois avec du PBS 1X 0,05% Tween®20 et montées dans du milieu de montage Vectashield® contenant du DAPI (Vector laboratories, Peterborough, Grande Bretagne). Les lames ont alors été analysées avec un microscope à fluorescence (Axio observer Z1, Carl Zeis MicroImaging GmbH, Jena, Allemagne) équipé d'un système d'analyse d'image (Axiovision, Carl Zeis MicroImaging GmbH, Jena, Allemagne).

j. Trap-assay

L'activité télomérase des produits d'expression des trois plasmides a été évaluée en utilisant un test basé sur la technique de la PCR appelée TRAP-assay pour « Telomeric Repeat Amplification Protocol ». Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le kit de détection Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS développé par Roche (Roche Diagnostics, Allemagne), selon les instructions du fabricant. Le principe du test est illustré en figure 14.

Brièvement, 24 heures après avoir été transfectées comme décrit ci-dessus, les cellules CRFK ont été prélevées et aliquotées en tubes falcon de 5mL, à une concentration de 2.10^6 cellules par tube. Après avoir été lavées dans du PBS et culottées par centrifugation 5 minutes à 3000g à 4°C, les cellules ont été remises en suspension dans 200µL de réactif de lyse fourni dans le kit, et incubées sur glace pendant 30 minutes. Une fois les cellules lysées, les tubes ont été centrifugés à 16000g pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer 175 µL de surnageant. Une partie de ces échantillons protéiques a alors été inactivée thermiquement

pendant 10 minutes à 85°C afin de servir de témoin négatif. Alors, 30µL d'un mélange constitué de 25µL de mix réactionnel (composé de desoxynucléotides triphosphates, de primers de la réaction TRAP, de primers témoins, et d'une Taq Polymérase) et de 5µL de standard international, tous deux fourni dans le kit, ont été ajouté à 2µL d'extrait protéique inactivé thermiquement ou non dans des tubes pour PCR sans RNase. Un contrôle positif (TS8) fourni dans le kit a été utilisé et le réactif de lyse seul a servi de témoin négatif pour la réaction PCR. Tous les mélanges réactionnels (contenant les extraits protéiques) ont dans un premier temps été incubés 20 minutes à 25°C et soumis ensuite à 33 cycles de PCR consistant en une première étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes suivi d'une étape d'hybridation à 50°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute 30 secondes. Une fois la réaction PCR effectuée, 2,5µL de produits d'amplification a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante avec un agent de dénaturation fourni dans le kit. Après avoir ajouté un tampon d'hybridation issu du kit de détection, 100µL du mélange ainsi obtenu ont été déposé dans des microplaques pré-couvertes de streptavidine et incubés pendant 2 heures à 37°C sous légère agitation. Les puits ont alors été lavés avec le tampon de lavage du kit et incubés avec un anticorps anti-digoxygenine couplé avec la peroxydase HRP (Horse Radish Peroxydase) pendant 30 minutes à température ambiante avec une légère agitation à 300 tours par minute. Le substrat de HRP a alors été introduit dans les puits à température ambiante sous légère agitation et la réaction enzymatique a été stoppée 15 minutes plus tard grâce à un réactif d'arrêt fourni dans le kit. L'absorbance à 450nm de chaque puits a alors été mesuré pour tous les puits. L'activité télomérase relative a alors été calculée en utilisant la formule suivante :

$$ATR = 100 \times ((A_s - A_{S0})/A_{S,IS})/((A_{TS8} - A_{TS8,O})/A_{TS8,IS})$$

A_s: Absorbance de l'échantillon

$A_{S,0}$: Absorbance de l'échantillon inactivé thermiquement

$A_{S,IS}$: Absorbance du standard international de l'échantillon

A_{TS8}: Absorbance du contrôle TS8

$A_{TS8,0}$: Absorbance du tampon de lyse

$A_{TS8,IS}$: Absorbance du standard international du contrôle TS8

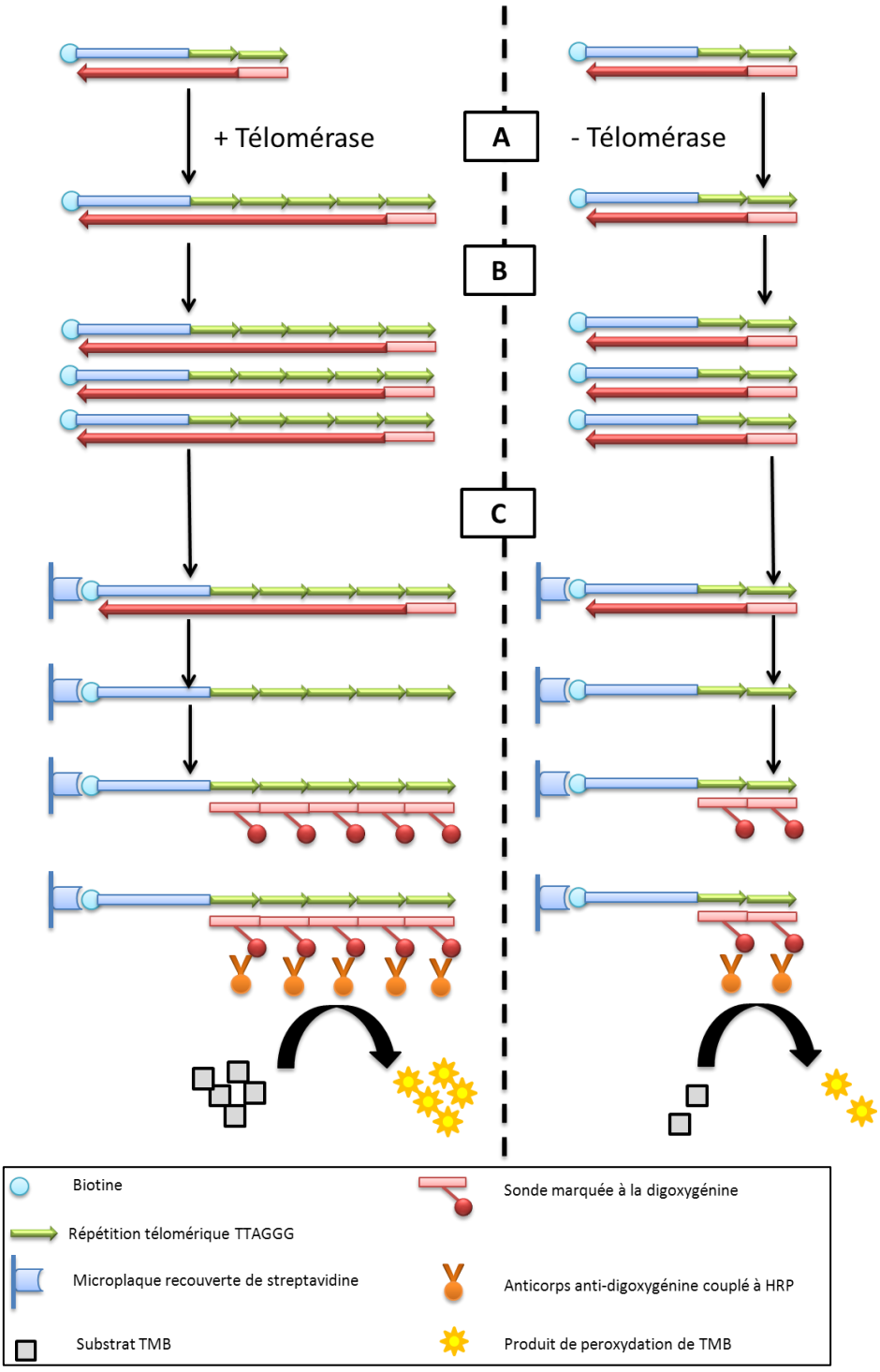

Figure 14 : Principe de l'ELISA TRAP-assay

Le test se déroule en trois étapes. (A) Tout d'abord, la télomérase, lorsqu'elle est présente ajoute des répétitions télomériques à l'extrémité 3' du précurseur ADN marqué à la biotine fournie dans le kit de détection. (B) Dans un deuxième temps, le fragment d'ADN, allongé ou non, est amplifié par PCR. (C) La troisième étape de détection se déroule en plusieurs phases : l'ADN double brin biotinylé est d'abord fixé sur une microplaque couverte de streptavidine, il est alors dénaturé et incubé avec une sonde complémentaire des répétitions télomérique conjuguée à de la digoxygénine. Un anticorps anti-digoxygénine couplé à la peroxydase HRP est alors ajouté et l'augmentation du nombre d'activité télomérique est mise en évidence par ajout du substrat TMB.

k. Immunisation et électroporation in-vivo de souris Balb/c ou C57-BL/6

L'immunisation intradermique (ID) a été effectuée sur les deux flancs préalablement tondus, crânialement à l'articulation coxo-fémorale, avec des seringues à insuline (U-100, 29GX1/2''-0,33X12 mm, Terumo, Belgique). Aucune réaction inflammatoire locale n'a été observée après la tonte, pendant ou après la procédure d'immunisation. L'immunisation intramusculaire a été effectuée dans chaque muscle tibial crânial en utilisant ici aussi des seringues à insuline U-100. Quelle que soit la voie d'administration, chaque animal a reçu une injection de primo vaccination de 100µg de plasmide pDUV5, pCDT ou pUF2. Tous les animaux ont reçu un rappel 14 jours après la primo-vaccination avec la même quantité de plasmide et la même voie d'administration. Directement après l'injection ID, des électrodes invasives (6X4X2, 47-0050, BTX, USA) ont été insérées dans la peau de telle sorte que le site d'injection ID soit placé entre les deux rangées d'aiguille, séparées l'une de l'autre de 0,4cm. Deux séries de décharges électriques à différents voltages ont alors été appliquées : 2 décharges à haut voltage suivi de 8 décharges à bas voltage. Après l'injection IM, chaque muscle tibial crânial a immédiatement été recouvert de gel d'échographie (Labo FH, gel de contact bleu, NM Médical, France) et l'électroporation effectuée en utilisant des électrodes palettes non-ivasives (BTX, USA), les deux palettes étant séparées l'une de l'autre de 0,5cm. Les paramètres d'électroporation sont les mêmes que ceux utilisés en ID. L'électroporateur Agilepulse® (BTX, USA) a été utilisé pour toutes les expérimentations.

Quelle que soit la voie d'administration (ID ou IM) des souris contrôles ont été utilisées et traitées selon la même procédure avec du PBS 1X à la place des plasmides.

l. Tests ELISPOT

Brièvement, des microplaques Polyfluorure de vinylidène (IFNγ ELISPOT kit, Diaclone, Abcyss, France, 10 X 96 tests, ref. 862.031.010P) ont dans un premier temps été incubées une nuit entière avec un anticorps de capture, anti-IFNγ murin, lavées et bloquées le lendemain avec du PBS 1X contenant 2% de lait en poudre. Les rates des souris préalablement immunisées ont alors été prélevées puis broyées. Les suspensions cellulaires issues de ce broyat ont ensuite été filtrées à travers des filtres en nylon de 70mm (Cell

Strainer, BD Biosciences, France). Les splénocytes purifiés par centrifugation sur gradient de Ficoll (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, France) ont été lavés, comptés puis ajoutés dans les plaques en triplicats à une concentration 2×10^5 ou 4×10^5 cellules par puits. Ils ont alors été stimulés avec 5µg/mL de peptides de la TERT canine, féline ou hybride sélectionnés *in-silico* comme indiqué ci-dessus. Des témoins positifs ont été stimulés avec de la Concavalin A à une concentration de 10µg/mL et des témoins négatifs ont été stimulés avec du milieu de culture frais ne contenant pas de SVF. Après 19 heures de stimulation à 37°C et 5% de CO_2, les plaques ont été lavées et mises en contact avec un anticorps de détection conjugué à de la biotine puis avec une solution de streptavidine-AP (Phosphatase Alcaline). Les spots formés par la sécrétion d'IFN-γ ont finalement été mis en évidence grâce à une solution de BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine / chlorure de nitro-blue tetrazolium). Les résultats ont alors été analysés en utilisant le dispositif et le logiciel de comptage Immunospot ELISPOT (CTL, Allemagne).

m. Tests de cytotoxicité in-vivo

Les cellules cibles ont été préparées à partir de splénocytes prélevées sur des souris C57/BL6 naïve. Elles ont été placées dans du PBS 1X contenant une forte (5µM), une moyenne (1µM) ou une faible (0,2µM) concentration en CFSE (Ester de Succinimidyl Carboxyfluoresceine, Vybrant CFDA-SE cell-tracer kit, Life technologies SAS, Saint-Aubin, France). Les splénocytes marqués avec 5µM et 1µM de CFSE ont ensuite été pulsés chacun avec 1 peptide de la TERT canine féline ou hybride restreint à H2 (p621 ou p987), à une concentration de 5µg/mL pendant une heure et demi à température ambiante. Les splénocytes marqués avec 0,2µM de CFSE n'ont pas été pulsés afin de servir de témoin négatif. Toutes les souris préalablement immunisées avec pDUV5, pCDT ou pUF2 ont reçus le dixième jour suivant l'injection de rappel, un mélange de 10^7 cellules marquées au CFSE contenant une quantité égale de chaque fraction de cellules cibles par voie intraveineuse, via la veine rétro-orbitaire. Quinze à dix-huit heures plus tard, des suspensions cellulaires issues des rates des souris immunisées ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant le cytomètre MACSQUANT (Myltenyii, Allemagne). La fluorescence des cellules en CFSE (équivalent FITC) a été mesurée pour chaque suspension.

La lyse spécifique des cellules pulsées avec les peptides de la TERT a alors été déterminée en comparant le ratio des populations cellulaires pulsées (fluorescence CFSE de

forte ou moyenne intensité) et non pulsées (fluorescence CFSE de faible intensité) chez les souris immunisées avec les plasmides par rapport à ce même ratio chez les souris contrôle. Le pourcentage de lyse spécifique par animal a été établi selon ce calcul :

$$\%\ Lyse\ spécifique = [1 - \frac{\frac{CFSE\ faible\ PBS}{CFSE\ forte\ ou\ moyen\ PBS}}{\frac{CFSE\ faible\ pADN}{CFSE\ forte\ ou\ moyen\ pADN}}] \times 100$$

CFSE *faible ou moyen ou forte* PBS : Nombre de splénocytes émettant une fluorescence en CFSE de faible, moyenne ou forte intensité provenant de souris immunisées avec du PBS

CFSE *faible ou moyen ou forte* pADN : Nombre de splénocytes émettant une fluorescence en CFSE de faible, moyenne ou forte intensité provenant de souris immunisées avec un des plasmides ADN (pDUV5 ou pUF2 ou pCDT)

n. Immunisation *in-vitro* de PBMCs canins

A J0, les PBMCs canins congelés ont été récupérés, comptés en utilisant le compteur cellulaire automatique Cellometer® Auto T4 Plus counter (Ozyme, France) et disposés dans des plaques 24 ou 48 puits à fond plat (BD, France) dans du milieu de culture AIM-V (Life technologies SAS, Saint-Aubin, France) supplémenté avec soit 100ng/mL de GM-CSF canin (R&D Systems, Minneapolis, USA) et 5ng/mL d'IL-4 canin (R&D systems, Minneapolis, USA), soit avec 50ng/mL de Flt3-L humain (Immunotools, Allemagne). Les cellules ont alors été mises en culture dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2.

Le jour suivant (J1), des cytokines favorisant la maturation des cellules dendritiques ont été ajoutées dans les puits. Il s'agissait de TNF-α canin à 50ng/mL, d'IL-1β canin à 20ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, USA) et d'IL-7 humain à 1ng/mL (Miltenyii Biotec, Paris, France). Quatre pools de peptides chevauchant de la télomérase canine ont alors été ajoutés dans les puits, de telle sorte que chaque peptide soit à une concentration finale de 10µg/mL. Les puits contrôles n'ont reçu que le cocktail de cytokines de maturation et pas de peptide.

A J3, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par de l'AIM-V frais. Le milieu de culture a alors été remplacé tous les trois jours jusqu'au jour de la récupération des cellules.

A J11 ou J18 après le début de la culture, les cellules ont été récupérées et lavées dans du milieu de culture AIM-V frais avant d'être utilisé dans un test ELISPOT IFN-γ fourni par R&D Systems (Minneapolis).

Brièvement, les cellules ont été réparties avec soit l'un des 4 pools de peptides (5µg/mL de chaque peptide du pool) dans du milieu AIM-V, soit du milieu seul, dans une plaques 96 puits préalablement couverte d'anticorps anti-IFN-γ canin. De la concavalin A à 10µg/mL ou de l'IFN-γ canin recombinant ont été utilisés comme témoin positif. Après 24 heures, les spots ont été mis en évidence grâce à un anticorps de détection anti-IFN-γ conjugué à de la biotine puis à de la streptavidine conjuguée à une peroxydase utilisant le substrat BCIP/NBT. Les spots ont été comptés en utilisant le lecteur Immunospot ELISPOT counter et le logiciel associé (CTL, Allemagne).

o. Analyses statistiques des données

Le logiciel Prism-5 a été utilisé pour l'analyse des données et les représentations graphiques. Les données représentées sont la moyenne ± l'écart type. Un test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique des tests ELISPOT un test de Kruskal-Wallis avec comparaison multiple pour les résultats des tests de cytotoxicité in-vivo. La significativité a été établie pour une valeur de p inférieure à 0,05.

II. Résultats

a. Les trois plasmides sont fonctionnels in-vitro

La première étape de notre travail a consisté à démontrer la fonctionnalité des trois plasmides dans des cellules de mammifères, c'est-à-dire à montrer que les trois constructions sont bien prises en charge et à l'origine de la production de TERT canine, féline ou hybride. Pour atteindre cet objectif, nous avons effectué des western-blots sur des cellules HeLa ou 293T, couramment utilisées pour ce type de procédure, préalablement transfectées avec pDUV5, pCDT ou pUF2 grâce au kit de transfection du commerce JetPRIME®. Les plasmides utilisés pour les tests in-vitro encodaient une protéine constituée de la TERT couplée aux 14 acides aminés du peptide V5 des influenzavirus. Ainsi pour mettre en évidence cette protéine de fusion sur les membranes de western blot, nous avons pu utiliser un anticorps anti-V5 couplé à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase).

Comme nous pouvons le voir sur la figure 15, nous avons mis en évidence une bande protéique de 123 kDa, poids moléculaire de la TERT, contenant l'antigène V5. Ce signal a été détecté dans les trois lots de cellules transfectées avec les constructions ADN contrairement aux cellules non traitées (NT), traitées avec le plasmide vide contrôle (vide) ou traitées uniquement avec l'agent de transfection (JP). Nous pouvons donc déduire de ces résultats que les polypeptides de 123kDa mis en évidence ne sont pas endogènes et qu'il ne s'agit pas d'un signal non-spécifique. Par conséquent, nous avons démontré ici que pDUV5 pCDT et pUF2 sont bien prises en charge et exprimés dans des cellules de mammifères.

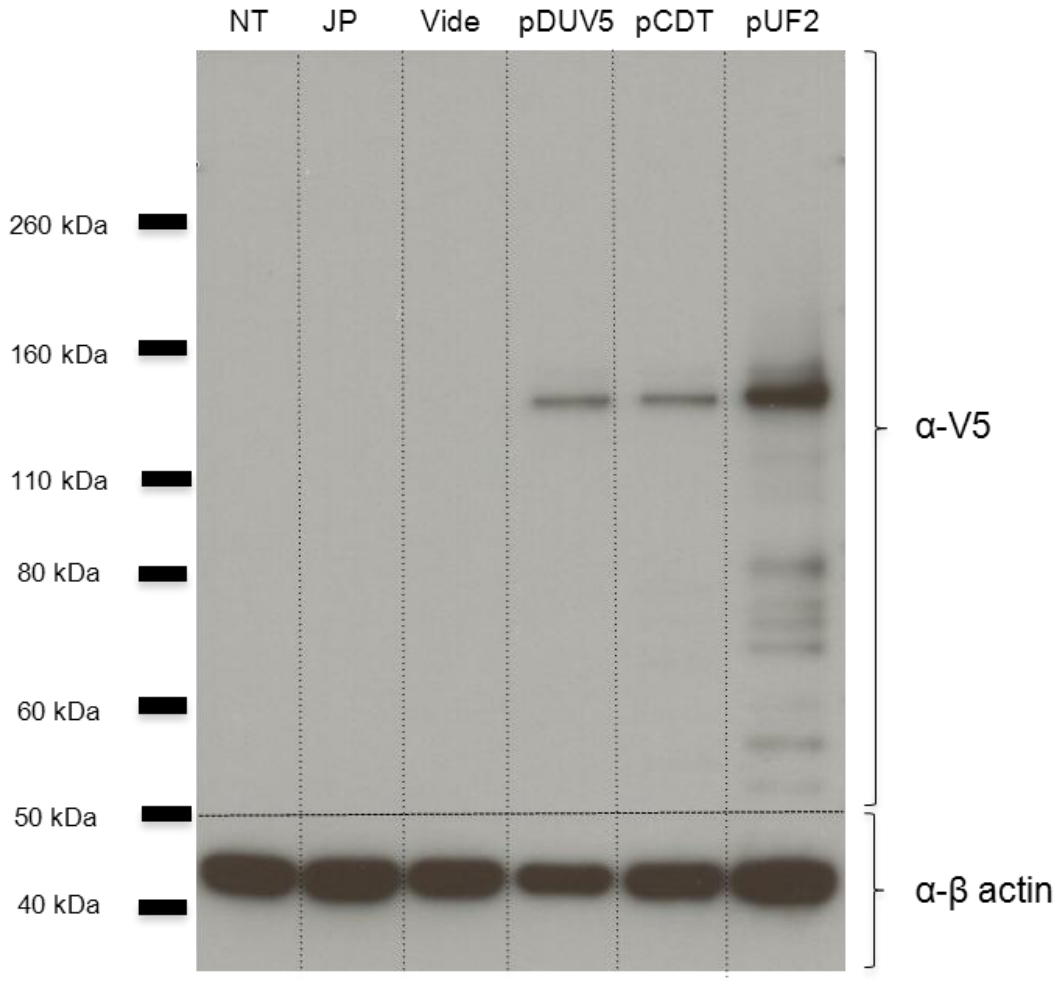

Figure 15 : pDUV5, pCDT et pUF2 encodent une protéine TERT détectée par Western-Blot après transfection in-vitro

Les TERT canines, hybrides et félines modifiées (123kDa) ont été détectées par Western-Blot parmi les extraits protéiques de cellules 293T, 24 heures après leur transfection avec les plasmides pDUV5, pCDT ou pUF2, en utilisant un anticorps primaire anti-V5 et un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase HRP. La protéine β-actine (43kDa) a été utilisée comme témoin positif pour le transfert et la migration protéique. NT : extrait protéique des cellules non-traitées ; JP : extrait protéique des cellules traités avec l'agent de transfection JetPrime seul ; Vide : extrait protéique des cellules transfectées avec le plasmide vide pCDNA 3.1 ; pDUV5 : extrait protéique des cellules transfectées avec pDUV5 ; pCDT : extrait protéique des cellules transfectées avec pCDT ; pUF2 : extrait protéique des cellules transfectées avec pUF2.

Une fois la fonctionnalité des trois plasmides démontrée, il était alors nécessaire, avant d'effectuer une preuve de concept chez le petit animal, de montrer l'innocuité des protéines d'intérêt après transfection *in-vitro* dans des cellules de mammifères.

b. Les trois constructions ADN encodant les TERT animales sont à l'origine d'enzymes non fonctionnelles et absentes des nucléoles

Une condition *sine qua none* au développement de toute nouvelle thérapie, quelle qu'elle soit, est de montrer que la molécule d'intérêt ne risque pas d'entrainer d'effets délétères chez le patient. Dans notre cas, l'innocuité de nos constructions est basée, d'une part, sur l'absence d'activité télomérase des produits d'expressions des plasmides car, dans le cas contraire, les cellules transfectées pourraient être immortalisées. Et, d'autre part, sur l'exclusion des enzymes des nucléoles : en effet, il s'agit du lieu d'activité principale de la TERT même si les conséquences de cette localisation sur l'activité télomérase sont discutées (Yang, Chen et al. 2002; Lin, Jin et al. 2008). Ainsi les TERT encodées par nos plasmides sont modifiées dans leur site catalytique et dans leur site d'adressage aux nucléoles.

Bien que la localisation intracellulaire et extranucléaire des produits d'expression des plasmides ne soit pas un facteur suffisant pour garantir leur innocuité comme rappelé ci-dessus, nous souhaitions tout de même éviter de les retrouver dans les nucléoles, où l'activité télomérase est naturellement maximale. Afin de justifier la modification dans le site d'adressage aux nucléoles qui ont été introduites dans les constructions, nous avons procédé à des tests d'immunofluorescence *in-vitro* après transfections de cellule HEK 293T en utilisant l'agent de transfection du commerce FugeneHD. Comme nous pouvons le constater sur la figure 17, les versions de l'enzyme TERT encodée par pDUV5, pUF2 ou pCDT, sont exclues des nucléoles contrairement à la télomérase native humaine hTERT que l'on retrouve dans cette localisation.

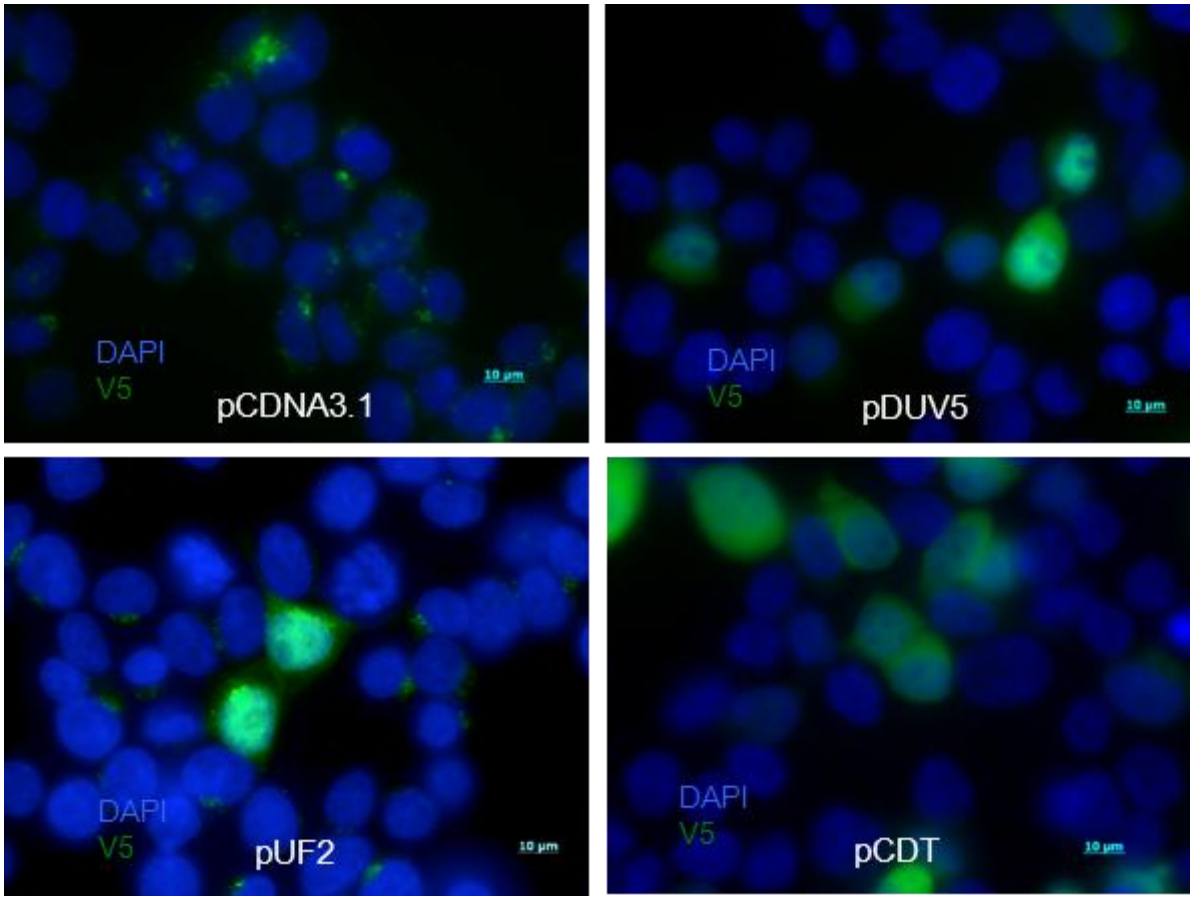

Figure 16 : Les protéines TERT modifiées sont exclues des nucléoles

Images représentatives de la localisation intracellulaire des produits d'expression de pDUV5, pCDT ou pUF2. Les protéines ont été détectées en utilisant le segment V5 inclus dans les séquences protéiques en utilisant un anticorps spécifique marqué par un fluorochrome (Alexa-fluor 488 – vert). L'ADN est marqué grâce à l'agent intercalant DAPI coloré en bleu. Les images montrent que pDUV5, pCDT et pUF2 encodent des protéines exclues des nucléoles, le site naturel de stockage et d'activité des télomérase.

Pour tester l'activité télomérase de nos produits, nous avons utilisé un test d'activité télomérase reposant sur la technologie PCR appelée essai TRAPeze. Le test se déroule en deux étapes : au cours de la première étape, si l'enzyme produit par la construction ADN est fonctionnelle, elle ajoute un certain nombre de répétitions des 6 nucléotides télomériques (GGTTAG) à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide substrat. Au cours de la seconde étape, l'oligonucléotide allongé dans un premier temps est amplifié par PCR, et l'augmentation du nombre de répétitions télomériques est finalement détectée en utilisant un test ELISA (cf. figure 14). Comme illustré en figure 16, les produits d'expression des plasmides pDUV5, pUF2 et pCDT ne présentent pas d'activité télomérase, contrairement à la TERT humaine

native. Ainsi, nous pouvons en conclure que nos trois constructions ADN expriment des versions non-fonctionnelles des TERT animales.

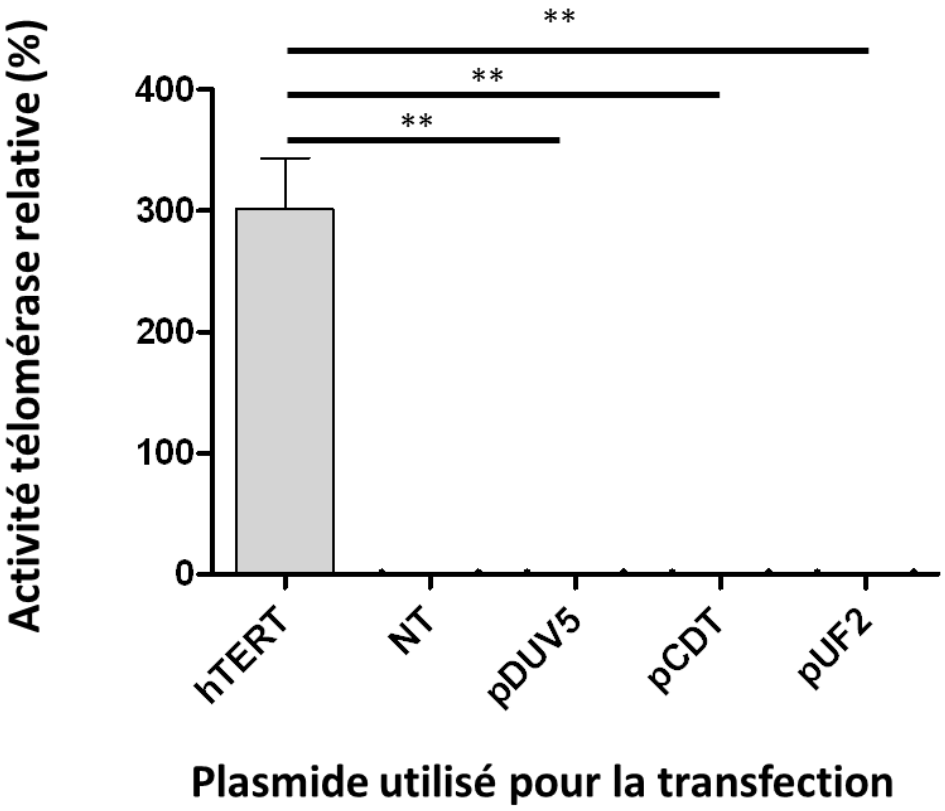

Figure 17 : Les protéines encodées par les plasmides ne présentent pas d'activité télomérase

Vingt-quatre heures après avoir été transfectées avec les plasmides ADN, les cellules CRFK ont été récupérées et lysées dans un tampon de lyse. Après centrifugation, 2,1µg de surnageant protéiques sont utilisés pour réaliser le test TRAP. L'amplification des télomères a été mise en évidence par méthode ELISA. On observe ici que les protéines encodées par les plasmides pDUV5, pCDT et pUF2 ne présentent pas d'activité télomérase, à l'image des extraits protéiques provenant des cellules CRFK non transfectées (NT), et contrairement à ceux provenant des cellules transfectées avec le plasmide encodant la TERT humaine native (hTERT). Les résultats présentés sont la moyenne ± l'écart-type. Des tests non paramétriques de Mann Whitney ont été effectués, la différence entre l'activité télomérase de hTERT et celle des protéines encodées par pDUV5, pCDT ou pUF2 sont toutes significatives (p<0,05).

Nous avons donc montré ici que les trois plasmides expriment des versions non fonctionnelles des TERT animales et que celles-ci sont exclues des nucléoles, lieu de leur activité principale. Nous allons maintenant montrer qu'elles sont capables de provoquer une réponse immunitaire à médiation cellulaire en modèle murin.

c. Les plasmides pDUV5, pCDT et pUF2 induisent une forte réponse immune cellulaire cytotoxique après immunisation et électroporation chez la souris.

Après avoir démontré que les trois constructions ADN étaient fonctionnelles et qu'elles ne présentaient, à priori, pas de risque *in-vitro* après transfection de cellules de mammifères, nous avons voulu tester leur immunogénicité *in-vivo* en modèle souris avant de les tester sur espèce cible (chien et chat).

Pour évaluer la capacité des plasmides à induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire, 100µg d'ADN par souris ont été injectés par voie intradermique ou intramusculaire puis une électroporation a immédiatement été pratiquée. Pour chaque protocole, des groupes de souris témoins ont été vaccinés avec du tampon PBS 1X. Deux semaines plus tard, les souris ont reçu une immunisation de rappel dans les mêmes conditions. Dix jours après cette seconde immunisation, les souris ont été sacrifiées et leurs rates prélevées afin de contrôler la réponse immunitaire cellulaire induite par la vaccination, grâce à un test ELISPOT IFN-γ en utilisant les peptides décrits dans le tableau 4. Pour mettre en évidence l'expansion des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques de la TERT testée, des souris C57-Bl/6 ont été vaccinées car les peptides qui ont été sélectionnés *in-silico* ont une affinité maximale pour H2-D^b. De même, des souris Balb/c ont été utilisées pour mettre en évidence l'expansion des lymphocytes T $CD4^+$ car l'affinité des peptides que sélectionnés est maximale pour l'haplotype H2-Ia^d.

Comme illustré en figure 18, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la fréquence des lymphocytes T $CD8^+$, sécrétant de l'IFN-γ, spécifiques de la TERT canine. Avec 2 des 3 peptides utilisés, la différence entre les groupes de souris vaccinées ou non-vaccinées est statistiquement significative ($p<0,05$). La différence entre les voies d'administration n'est significative que pour le peptide p621 et p987 (Résultats des tests non paramétriques de Mann Whitney. p580 : p=0,053 ; p621 : p=0,006 ; p987 : p=0,0006). Nous avons également cherché à montrer que la vaccination induit une augmentation de la fréquence des lymphocytes T $CD4^+$ sécrétant de l'IFN-γ spécifiques de la TERT canine, mais jusqu'à présent, nous n'avons constaté que des différences non statistiquement significatives

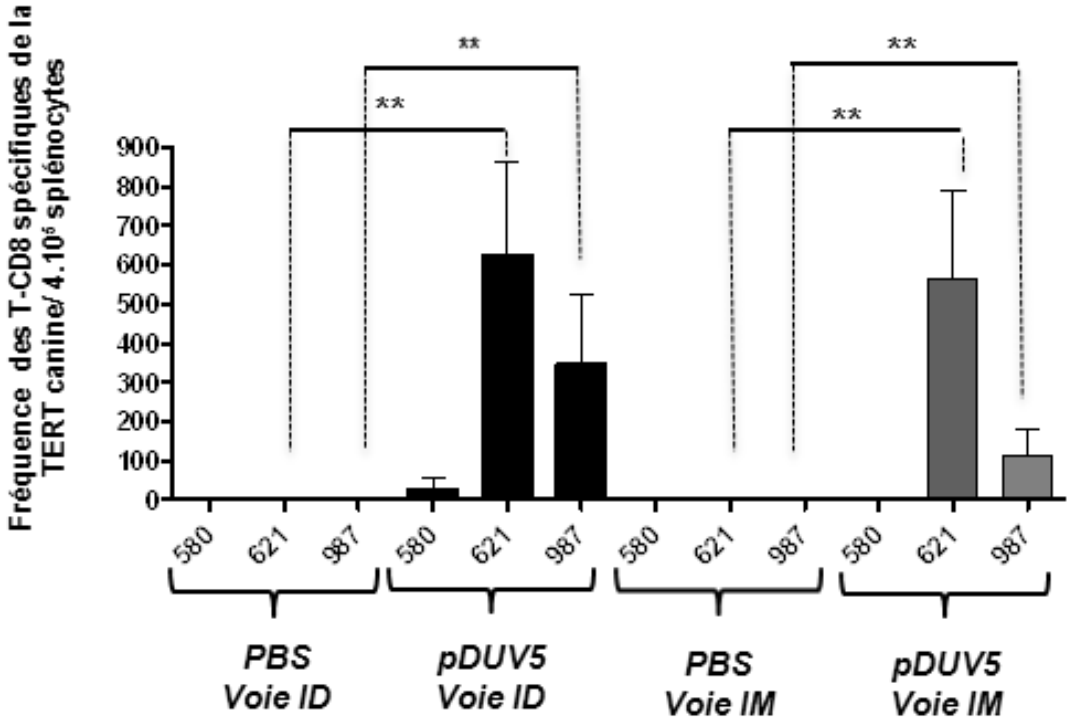

Figure 18 : L'immunisation avec pDUV5 entraine une réponse cellulaire CD8 dirigée contre des peptides retreints H2-D^{b} de la TERT canine chez la souris

Des souris femelles C57/Bl6 de 7 semaines d'âge ont été immunisées par voie ID ou IM (10 souris par groupe) avec 100µg de plasmide pDUV5 à J0 et ont reçu un rappel à J14. En parallèle, des souris contrôles ont reçu du PBS par voie ID ou IM (6 souris par groupe) selon le même protocole. Dix jours après le rappel, les rates de toutes les souris ont été prélevées. Les splénocytes ont été purifiés par Ficoll et stimulés en triplicats avec des peptides de classe I sélectionnés après prédiction épitopique *in-silico* (p580, p621 ou p987) à 5µg/mL pendant 19 heures. Les spots mesurés pour 4.10^5 cellules par puits ont été révélés grâce un anticorps de détection couplé à de la biotine suivi de streptavidine couplé à une peroxydase à laquelle on a ajouté la solution substrat BCIP/NBT. Les résultats présentés sont la moyenne ± l'écart-type. Des tests non paramétriques de Mann Whitney ont été effectués, * : *p*-value < 0,05 ; ** : *p*-value < 0,01

De la même manière, la vaccination avec pUF2 a induit l'expansion des lymphocytes T CD8^{+} sécréteurs d'IFN-γ spécifiques de la TERT féline CD8 positifs (figure 19-A) et CD4^{+} (figure 19-B). Ici aussi les différences de fréquence entre les groupes de souris vaccinés et non-vaccinés étaient statistiquement significatives pour plusieurs peptides (*p<0,05*). Aucune différence entre les voies d'administration n'a été mise en évidence (Résultats des tests non paramétriques de Mann Whitney. p580 : *p*=0,69 ; p621 : *p*=0,699 ; p987 : *p*=0,09 ; p1105 : *p*=0,39 ; p1106 : *p*=0,39).

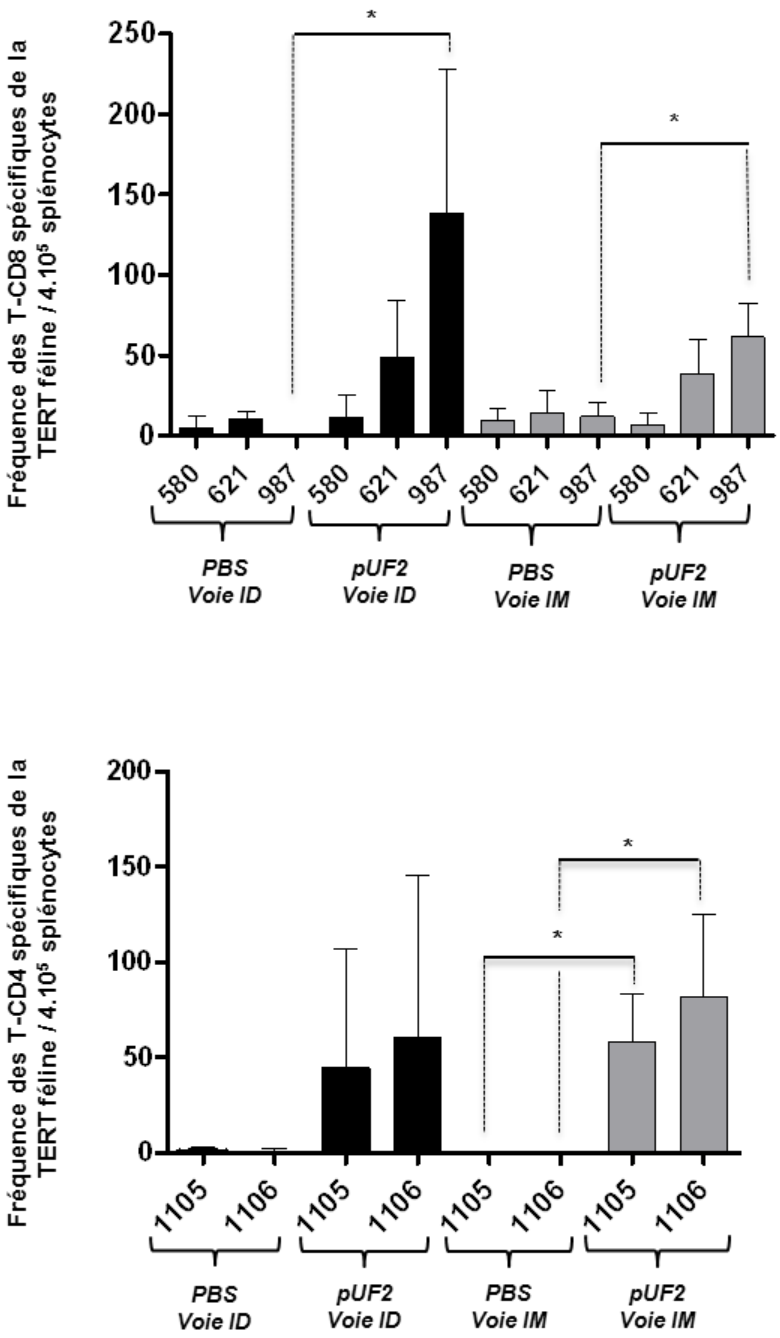

Figure 19 : L'immunisation avec pUF2 entraine une réponse cellulaire CD8 et CD4 dirigée contre des peptides retreints H2-D^{b} ou H2-Ia^{d} de la TERT féline chez la souris

Des souris femelles C57/Bl6 (A) ou Balb/c (B) de 7 semaines d'âge ont été immunisées par voie ID ou IM (6 souris par groupe) avec 100µg de plasmide pUF2 à J0 et ont reçu un rappel à J14. En parallèle, des souris contrôle ont reçu du PBS par voie ID ou IM (3 souris par groupe) selon le même protocole. Dix jours après le rappel, les rates de toutes les souris ont été prélevées. Les splénocytes ont été purifiés par Ficoll et stimulés en triplicats avec (A) des peptides de classe I (p580, p621 ou p987) ou (B) de classe II (p1105 ou p1106) sélectionnés après prédiction épitopique in-silico à 5µg/mL pendant 19 heures. Les spots ont été révélés grâce un anticorps de détection couplé à de la biotine suivi de streptavidine couplé à une peroxydase à laquelle on a ajouté la solution substrat BCIP/NBT. Les résultats présentés sont la moyenne ± l'écart-type. Des tests non paramétriques de Mann Whitney ont été effectués, * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01

Enfin, nous avons pu mettre en évidence le même phénomène avec pCDT. Nous pouvons observer l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD8 sécréteurs d'IFN-γ spécifiques de la TERT hybride en figure 20-A, et l'augmentation de la fréquence des CD4 en figure 20-B. Il existe une seule différence significative entre les voies d'administration concernant le peptide p1106 (Résultats des tests non paramétriques de Mann Whitney. p580 : p=0,25 ; p621 : p=0,22 ; p987 : p=1,0; p951 : p=0,24 ; p1105 : p=0,195 ; p1106 : p=0,0056 ; p1109 : p=0,138).

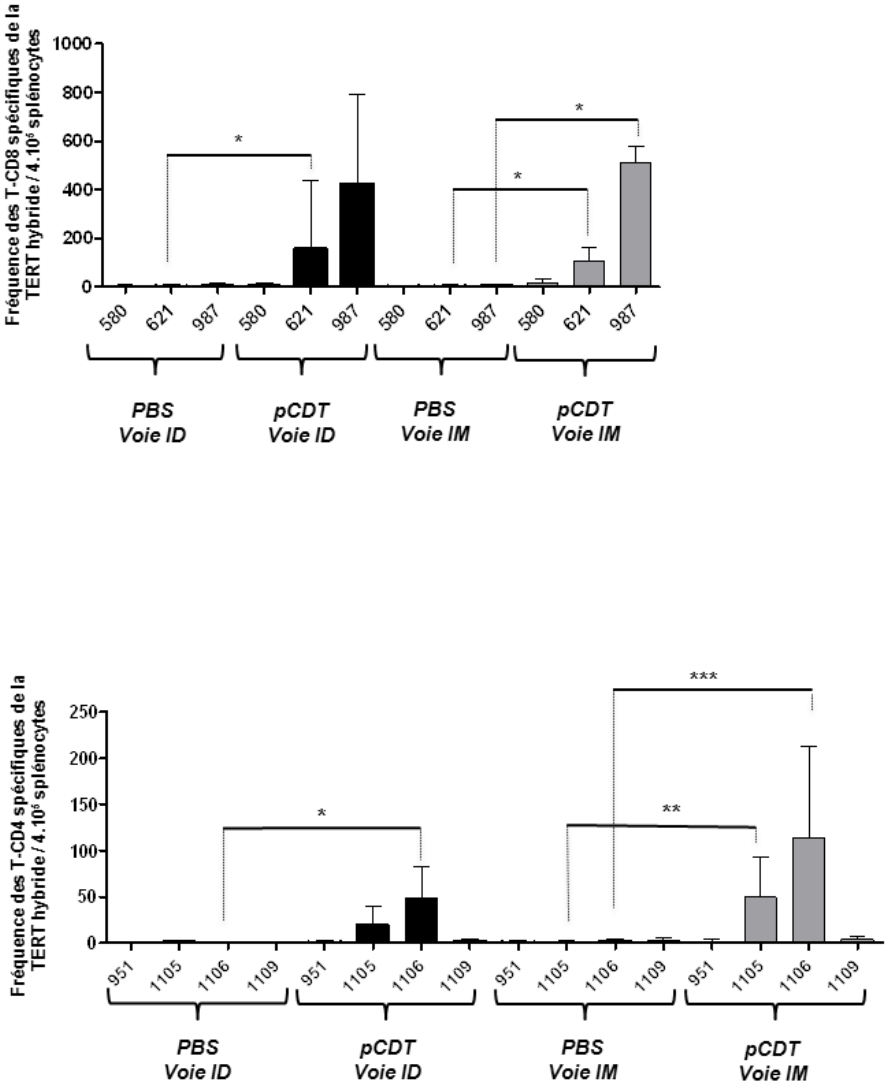

Figure 20 : L'immunisation avec pCDT entraine une réponse cellulaire CD8 et CD4 dirigée contre des peptides retreints H2-D^{b} ou H2-Ia^{d} de la TERT féline chez la souris

Des souris femelles de 7 semaines d'âge ont été immunisées par voie ID ou IM avec 100µg de plasmide pCDT ou avec du PBS à J0 et ont reçu un rappel à J14. Dix jours après le rappel, les rates de toutes les souris ont été prélevées. Les splénocytes ont été purifiés par Ficoll et stimulés en triplicats avec des peptides sélectionnés après prédiction épitopique in-silico à 5µg/mL pendant 19 heures. Les spots ont été révélés grâce à un anticorps de détection couplé à de la biotine suivi de streptavidine couplé à une peroxydase à laquelle on a ajouté la solution substrat BCIP/NBT.

(A) Le groupe vacciné était composé de 5 souris C57/Bl6 et le groupe contrôle de 3 souris. Les splénocytes ont été stimulés avec les peptides de classe I p580, p621 et p987. Les résultats représentent la fréquence des cellules T CD8 productrices d'IFN-γ spécifiques des peptides.
(B) Le groupe vacciné était composé de 9 souris Balb/c vacciné en IM et 5 en ID et le groupe contrôle de 8 souris vacciné par voie IM et 4 par voie ID. Les splénocytes ont été stimulés avec les peptides de classe II p951, p1105, p1106 et p1109. Les résultats représentent la fréquence des cellules T CD4 productrices d'IFN-γ spécifiques des peptides.

Les résultats présentés sont la moyenne ± l'écart-type. Des tests non paramétriques de Mann Whitney ont été effectués, * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01

Ainsi, les trois constructions ADN encodant les TERT animales sont capables d'induire l'expansion de lymphocytes T spécifiques, $CD8^+$ et $CD4^+$, sécréteurs d'IFN-γ chez la souris après injection et électroporation.

Dans la perspective d'utiliser ces plasmides en thérapie anti-cancéreuse, nous avons ensuite voulu savoir si les CD8 induits par la vaccination avaient la capacité de lyser des cibles cellulaires exprimant les peptides de la TERT. Pour mettre en évidence cette activité cytotoxique, des souris C57-Bl/6 ont été immunisées en ID ou IM avec 100µg d'ADN deux fois à deux semaines d'intervalle. Dix jours après la deuxième injection, des splénocytes provenant de souris naïves ont été injectés par voie intraveineuse chez les souris vaccinées. Ces splénocytes ont préalablement été marqués avec des concentrations différentes de CFSE suivant qu'ils ont été chargés ou non avec les peptides de la TERT. Quinze à dix-huit heures plus tard, la lyse spécifique de ces cibles marquées au CFSE a été mesurée par cytométrie en flux. Comme le montre la figure 21, la vaccination avec les plasmides permet la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique et spécifique vis-à-vis des TERT animales. En effet, dans chaque cas de figure, on retrouve pour au moins un des peptides considérés, une lyse spécifique en moyenne supérieure à 50%.

Pour certaines souris le pourcentage de lyse dépasse même 90% (c'est le cas de deux souris vaccinées avec pCDT). La voie ID est meilleure que la voie IM de façon statistiquement significative en ce qui concerne la vaccination avec pUF2 et pCDT pour la lyse spécifique des splénocytes chargés avec le peptide p621. Dans les autres cas les deux voies d'administration ne présentent pas de différence significative statistiquement parlant.

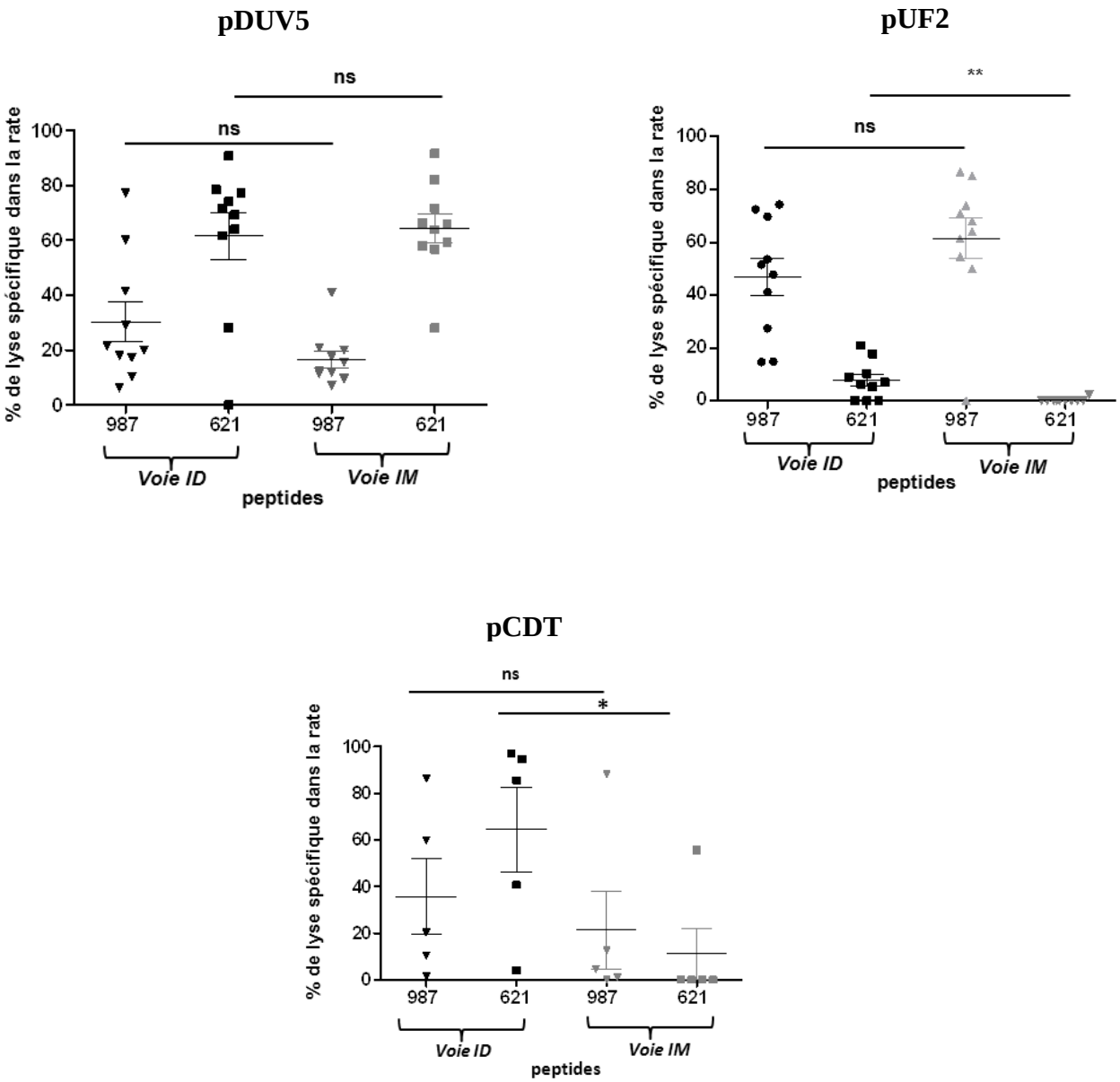

Figure 21 : L'immunisation avec pDUV5, pCDT ou pUF2 entraine une cytolyse spécifique in-vivo dirigée contre des cibles chargées avec des peptides de la TERT

Des souris femelles C57/Bl6 de 7 semaines ont été immunisées par voie ID ou IM avec 100µg de plasmide pDUV5, pCDT ou pUF2 à J0 et ont reçu un rappel à J14. Neuf jours après le rappel, des splénocytes syngéniques chargées avec des peptides de classe I de la TERT (p987 ou p621), ou non chargés ont été marqués avec de l'ester de succinimidyl carboxyfluorescein-diacetate (CFSE) à trois concentrations différentes : Forte= 1µM (cellules chargées avec p987) ; Moyenne = 0,5µM (cellules chargées avec p621) ; Faible = 0,1µM (cellules non chargées). Le même nombre de cellules marquées avec des concentrations fortes, moyennes et faibles de CFSE a été injecté en IV aux souris vaccinées. Après 15-18 heures, la disparition dans la rate des cellules pulsées avec les peptides a été déterminée par cytométrie en flux. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé par comparaison des ratios de cellules chargées et non chargées entre les souris vaccinées et les souris contrôle. Les données représentées sont les pourcentages de lyse spécifique dans la rate pour chaque souris après immunisation ID ou IM. Les barres horizontales montrent le pourcentage de lyse moyen pour chaque peptide, les écarts-types sont également représentés. Les résultats ont été analysés à l'aide d'un test de Kruskall-Wallis avec comparaisons multiples de Dunn. Les résultats sont statistiquement significatifs pour p-value < 0,05.

Nous avons donc montré ici que les trois constructions ADN encodant les TERT animales sont immunogènes en modèle souris et, que la population de lymphocytes T CD8 induite par la vaccination, est douée de facultés cytotoxiques. Ces données acquises, nous avons ensuite voulu tester la présence chez les espèces cibles, de populations lymphocytaires spécifiques des TERT animales. En effet, cette vaccination ne pourra fonctionner chez le chien ou le chat seulement s'il existe naturellement un répertoire de lymphocytes T spécifiques de la TERT.

d. Un répertoire de lymphocytes T spécifiques de la TERT canine existe chez le chien sain

Après avoir démontré la fonctionnalité et l'innocuité in-vitro de nos trois plasmides ainsi que leur immunogénicité in-vivo en modèle souris, nous avons voulu, dans un troisième temps, explorer l'existence d'un répertoire de lymphocytes T spécifique de la TERT canine chez le chien sain. Nous nous sommes restreints au chien pour des raisons de coût et surtout de disponibilité des produits nécessaires à l'expérimentation.

Le principe de l'étude était d'amplifier *in-vitro* des cellules T canines spécifiques de la TERT canine et sécrétrices d'IFN-γ isolés du sang total d'un chien sain, et de révéler cette expansion à l'aide d'un test ELISPOT IFN-γ. La technique utilisée ici a été décrite par Roberto Mallone et son équipe pour les PBMCs humains (Martinuzzi, Afonso et al. 2011). Le principe de l'expérience est exposé en figure 22. Brièvement, les cellules mononucléées du sang périphériques (PBMCs) ont été purifiées par Ficoll et mises en culture toute une nuit dans du milieu AIM-V pur, ou contenant soit du Flt3-L humain soit de l'IL-4 et du GM-CSF canin afin de dériver une partie des PBMCs en cellules dendritiques. Des pools de peptides issus de la TERT canine ont alors été ajoutés dans les puits de culture avec un cocktail de cytokines comprenant de l'IL-1β, du TNF-α canins et de l'IL-7 humain. Les peptides utilisés ici sont des 15mer chevauchant couvrant 1/3 de la TERT canine (figure 13-A) et chaque pool contenait 17 ou 18 peptides (figure 13-B). Le but de cette étape est de transformer les cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes supposées présenter les peptides de la TERT canine aux lymphocytes T spécifiques sécréteurs d'IFN-γ et promouvoir leur expansion. Les cellules en culture ont alors été prélevées à 11 ou 18 jours de culture et la

présence de lymphocytes T spécifiques de la TERT sécréteurs d'IFN-γ est alors révélée par ELISPOT IFN-γ.

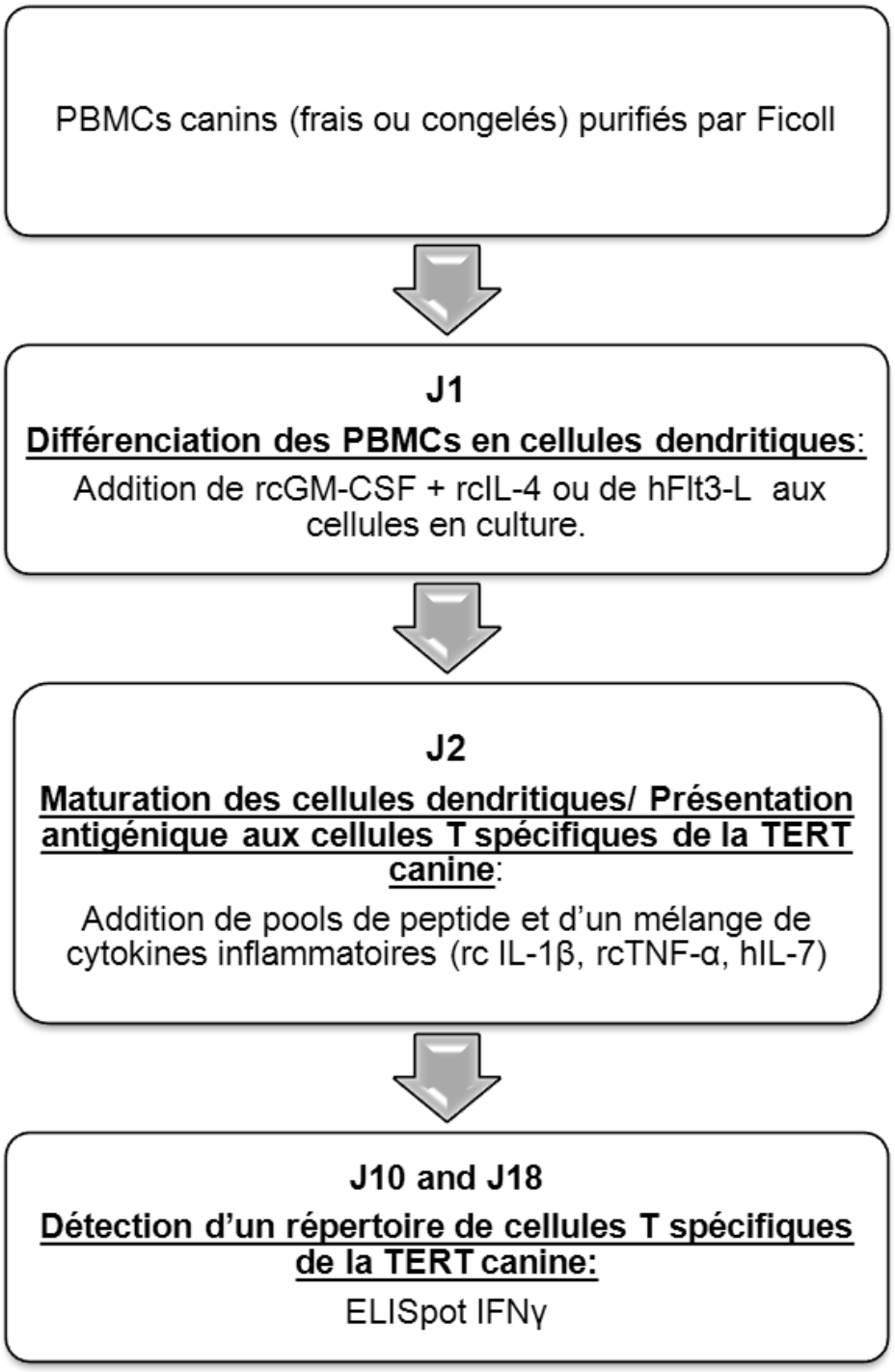

Figure 22 : Principe de l'immunisation in-vitro

Des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) de chien, frais ou congelés, ont été incubées pendant 24 heures avec soit du GM-CSF et de l'IL-4 canin, soit du Flt3-L humain. Des cytokines pro-inflammatoires favorisant la maturation des cellules dendritiques (IL-7 humain, TNF-α et IL-1β canins) ont alors été ajoutées, ainsi que des peptides recouvrant de la TERT canine séparés en 4 pools, pendant 3 jours. Après 11 ou 18 jours de culture, les cellules ont été récoltées et les lymphocytes T sécréteurs d'IFN-γ spécifiques de la TERT canine ont été révélés par ELISPOT IFN-γ.

Nous avons mis en évidence que les cellules T spécifiques de la TERT canines stimulés avec le pool 2 (condition GM-CSF et IL-4) ont été amplifiées d'un facteur 3 par rapport au PBMCs stimulés avec le milieu seul après 11 jours de culture. De même, à J11, on observe que les cellules stimulées avec le pool 4 (Condition Flt3-L) ont été amplifiées d'un facteur 2 par rapport au témoin (Figure 23-A).

Après 18 jours de culture, les lymphocytes T sécréteurs d'IFN-γ spécifiques de la TERT canine stimulés avec le pool 4 en présence de Flt3-L ont une fréquence 4 fois supérieure à celles des cellules stimulées avec le milieu de culture seul (Figure 23-B).

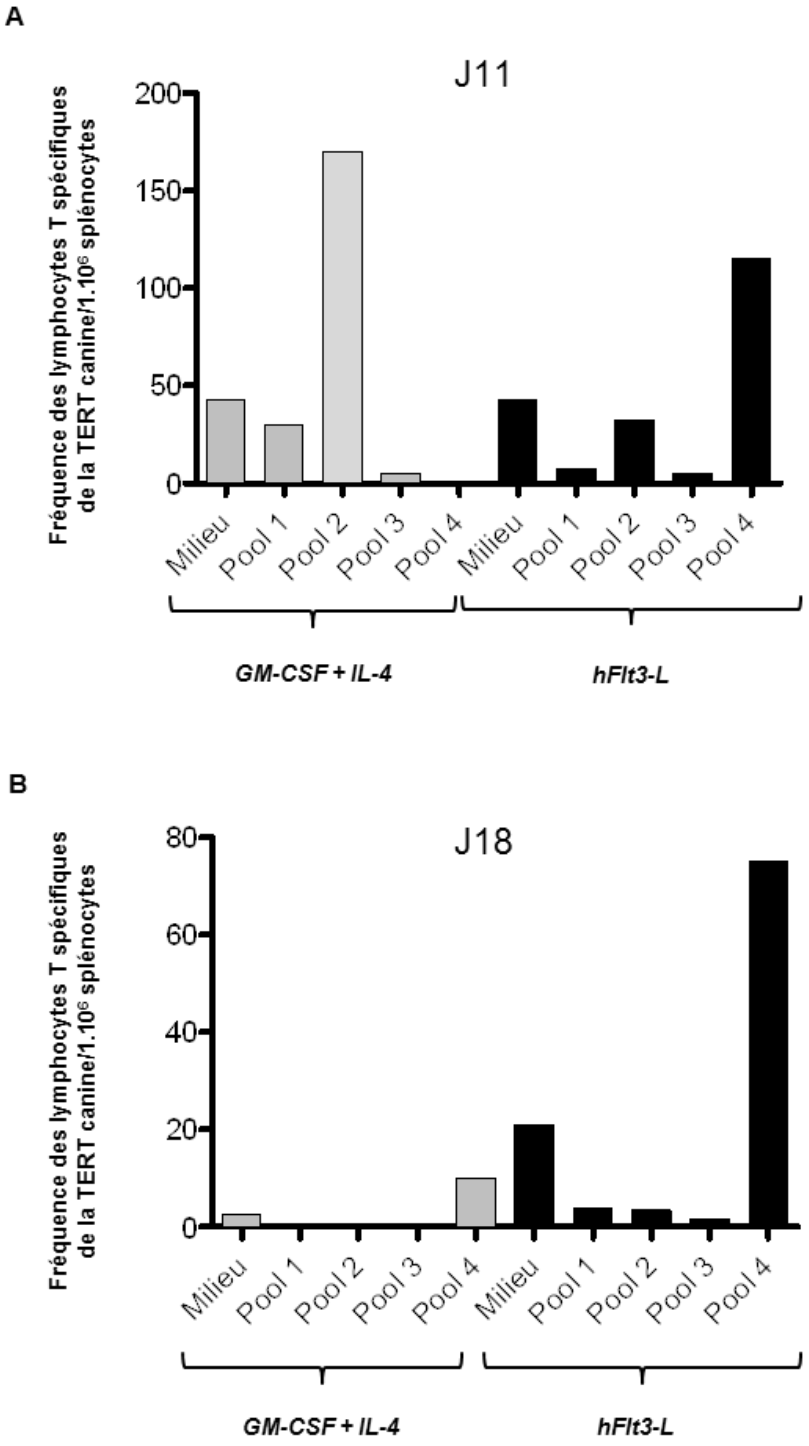

Figure 23 : Un répertoire de lymphocytes T spécifiques de la TERT canine, sécréteurs d'IFN-γ existe chez le chien sain

Des PBMCs canins congelés ont été incubés pendant 24 heures avec soit du GM-CSF et de l'IL-4 canin, soit avec du Flt3-L humain, puis mis en contact pendant 3 jours avec des peptides de la TERT canine se recouvrant de 11 résidus, et des cytokines favorisant la maturation des cellules dendritiques (IL-7 humain, TNF-α et IL-1β canin). Après 11 ou 18 jours de culture, les cellules en culture ont été récupérées afin de réaliser un test ELISPOT IFN-γ. Les résultats montrent la fréquence des lymphocytes T spécifiques des peptides de la TERT canine, sécréteurs d'IFN-γ par millions de PBMCs canins après 11 jours (A) ou 18 jours (B) de culture.

Ces résultats démontrent la présence naturelle de répertoires de lymphocytes T sécrétant de l'IFN-γ et spécifiques d'épitopes de la TERT canine dans le sang périphériques de ce chien d'expérimentation sain. Cette expérience mérite d'être répété à la fois chez d'autres animaux sains pour voir si l'on peut généraliser ces résultats, et chez des animaux cancéreux afin de voir si le cancer a un impact sur ces clones et justifier ainsi l'intérêt de vacciner des chiens avec un cancer.

III. Discussion

En bilan de cette étude, nous constatons que les trois constructions plasmidiques sont exprimées par des cellules de mammifères et que cette expression donne lieu à la production d'enzymes dépourvues d'activité télomérase et exclues de leur site d'action privilégié, les nucléoles. Ces paramètres sont donc autant d'arguments en faveur, à la fois, de la fonctionnalité des plasmides, mais aussi de leur innocuité d'un point de vue oncogénique. Nous avons également montré que la vaccination de souris à l'aide de ces trois vaccins permet la mise en place d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire mettant en jeu des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, spécifiques de la TERT testés, et que parmi la population de T $CD8^+$, il existe un contingent de cellules cytotoxiques capables de lyser spécifiquement des cibles exposant à leur surface des peptides de la TERT. Les trois vaccins ADN sont donc immunogènes en modèle souris. Enfin, nous avons montré qu'il existe chez le chien sain une population de lymphocytes T sécréteurs d'IFN-γ spécifiques d'épitopes de la TERT canine. Cette donnée, si elle est confirmée chez d'autres chiens sains et chez des chiens malades, rend notre projet de vaccin d'autant plus pertinent.

La prochaine étape de notre investigation consistera à tester ces trois constructions sur les espèces cibles. Nous nous focaliserons dans un premier temps sur le chien, pour des raisons de disponibilité des réactifs, en testant la capacité de pDUV5 à induire une réponse immunitaire cellulaire chez des chiens sains. Cette étude sera aussi l'occasion de tester l'efficacité du protocole d'électroporation par voie intradermique chez le chien qui s'inspire de celui utilisé chez l'homme. En effet, bien que réputée plus immunogène que la voie intramusculaire, la plupart des immunothérapies testées dans l'espèce canine combinant vaccins ADN et électroporation n'utilise pas la voie intradermique si bien que nous n'avons pas trouvé dans la littérature scientifique d'étude rapportant ce type de procédure chez le chien.

Pour cela, nous avons envisagé un protocole de vaccination illustré en figure 24. Cinq à six chiens beagle de 1,5 an en bonne santé recevront 3 injections de plasmides à 21 jours d'intervalle par voie intradermique immédiatement suivie d'une électroporation en utilisant les paramètres d'électroporation humaine. La réponse cellulaire spécifique sera évaluée au dates indiqués (J-7, J0, J14, J21, J35, J42, J56) par ELISPOT IFN-γ en utilisant les PBMCs

des chiens vaccinés et des peptides recouvrant la totalité de la télomérase. En parallèle, un suivi clinique et biologique (biochimique et hématologique) de chaque animal sera effectué afin de surveiller l'apparition d'une éventuelle toxicité aigüe.

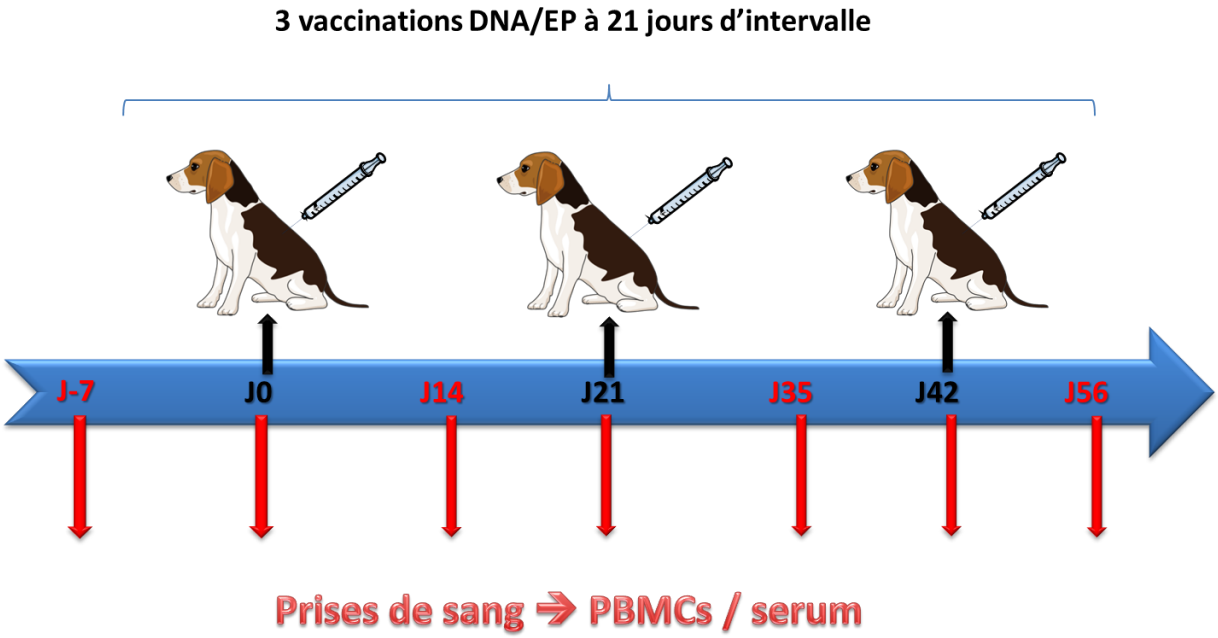

Figure 24 : Protocole de vaccination de chiens d'expérimentation

Cinq à six chiens beagle d'expérimentation âgé de 1,5 an recevront 3 injections vaccinales à 3 semaines d'intervalle l'une de l'autre. Chaque injection de plasmide sera suivie d'une électroporation en utilisant les paramètres utilisés en électroporation humaine. Sept jours avant le début du protocole, le jour de chaque injection et 14 jours après chaque injection, un prélèvement de sang sera effectué sur chaque animal. Un test ELISPOT INF-γ sera effectué en utilisant des peptides recouvrant l'intégralité de la télomérase canine. En parallèle un suivi clinique de tous les animaux sera effectuée, différents paramètres biochimiques seront dosés et une numération formule sera effectuée.

Si les constructions se révèlent immunogènes chez l'animal sain, la suite de notre démarche sera alors de tester nos produits sur des animaux atteints de cancer. Une équipe italienne a déjà testé une immunothérapie ciblant la TERT canine, sur des chiens atteints de différents sous-types de lymphome B (Peruzzi, Gavazza et al. 2010). Leur protocole vaccinal, réalisé en parallèle d'une chimiothérapie conventionnelle, est constitué de deux injections d'adénovirus encodant la TERT canine à deux semaines d'intervalle suivi, 4 semaines plus tard, par un ou plusieurs cycles de 5 injections par voie intramusculaire à 2 semaines

d'intervalle, d'un plasmide encodant cette même TERT immédiatement suivi par une électroporation. Les résultats de cette étude montre tout d'abord un bénéfice significatif de la vaccination en terme de temps avant le premier échappement et surtout en terme de survie par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu que la chimiothérapie conventionnelle. Cependant, cette étude nous montre également que la rupture de tolérance vis à vis de l'auto-antigène que constitue la TERT est permise par l'utilisation d'un vecteur viral et que les niveaux de réponses sont en moyennes plus faibles avec l'emploi du plasmide. Nous pouvons donc nous interroger sur la capacité du seul protocole vaccin ADN/électroporation à provoquer cette rupture de tolérance. Nous espérons que l'utilisation de la voie intradermique nous permettra d'obtenir un meilleur niveau de réponse.

En effet, Bergman et son équipe ont montré l'efficacité de l'utilisation d'un vaccin ADN administré par cette voie dans le traitement de chiens souffrants d'un mélanome malin de la cavité orale, même si l'implication de l'immunité à médiation cellulaire n'a pas été clairement établie (Grosenbaugh, Leard et al. 2011). Ce vaccin est composé d'un plasmide encodant la tyrosinase humaine et est administré par voie transdermique sans électroporation à l'aide d'un « gene-gun » sans aiguille. Ce médicament est le premier vaccin ADN approuvé aux Etats-Unis par la FDA chez le chien. Pour expliquer l'efficacité de leur vaccin, les auteurs avancent l'hypothèse que la rupture de tolérance est permise par la xénogénicité du produit d'expression de leur plasmide. A la lumière de cet exemple, il serait intéressant de comparer, chez le chien, les niveaux de réponse provoqués par la vaccination avec pDUV5 ou pCDT vis-à-vis d'épitopes de la TERT canine. On est en mesure d'espérer que les épitopes xénogéniques de la TERT hybride permettront d'augmenter la réponse effectrice vis-à-vis des épitopes syngéniques, autrement dit, vis-à-vis des épitopes communs à la TERT hybride et à la TERT canine.

Dans la perspective d'une utilisation en clinique de ces vaccins, il serait intéressant de tester leur utilisation en combinaison avec les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles, c'est à dire chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie. En effet, comme l'illustre les travaux de Peruzzi (Peruzzi, Gavazza et al. 2010) et Bergman (Grosenbaugh, Leard et al. 2011) non seulement elles n'empêchent pas la mise en place de la réponse immune, mais de nombreux travaux montrent même qu'elles seraient immunogènes. Il a par exemple été montré que la chimiothérapie combinée à l'immunothérapie pouvait affecter la présentation croisée (van der Most, Currie et al. 2006), réduire le nombre de T-régulateurs (Ghiringhelli, Menard et al.

2007) ou encore activer la prolifération lymphocytaire (Dudley, Wunderlich et al. 2002). Cependant, de nombreux travaux devront encore être réalisés afin d'inclure ces constructions ADN dans un schéma thérapeutique global prenant en compte à la fois, la nature précise de la tumeur, le protocole de chimiothérapie, de radiothérapie et de chirurgie permettant d'obtenir le meilleur résultat possible en terme de thérapeutique anti-tumorale avec comme objectif final, l'éradication totale et définitive de la tumeur.

Enfin, afin d'optimiser l'efficacité de vaccins thérapeutiques, il serait intéressant de les tester en combinaison avec d'autres immunothérapies. Le GM-CSF et l'IL-2 (Jourdier, Moste et al. 2003; Finocchiaro and Glikin 2008) ont montré leur intérèt dans le traitement de certaines tumeurs du chien, tels que le mélanome, et du chat, comme le complexe fibrosarcome félin. Grâce à leurs propriétées stimulatrices des cellules dendritiques, en ce qui concerne le GM-CSF, et des lymphocytes T, pour l'IL-2, ces molécules pourraient être utilisées en tant qu'adjuvants pour des vaccins thérapeutiques anti-cancer.

Pour terminer nous pouvons remarquer que cette étude chez le chien pourra avoir une valeur translationelle pour le traitement des cancers humains. Le fait que cette thérapie fonctionne chez le chien serait un argument en faveur du développement d'un vaccin similaire chez l'homme car comme l'explique Khanna (Khanna, London et al. 2009) et Paoloni (Paoloni and Khanna 2007), de nombreuses tumeurs canines et humaines partagent des caractéristique cliniques et moléculaires que l'on ne retrouve pas dans d'autres espèces plus couramment utilisées en expérimentation animale. Le résultat d'une telle étude donnera une bonne idée de l'effet d'un vaccin télomérase sur l'homme.

CONCLUSION

La progression des thérapies anti-cancéreuse passe obligatoirement par une connaissance de plus en plus précise de chaque tumeur prise au cas par cas, d'un point de vue génétique et phénotypique. A fortiori, l'utilisation d'immunothérapies et de vaccins anti-cancer nécessite une compréhension fine, à la fois, des différents acteurs de la relation entre le système immunitaire et les différents types tumoraux, mais aussi de leurs modalités d'interactions. Par ailleurs, les modalités de réaction pouvant varier grandement d'un sujet à un autre, il semble que dans l'avenir, les thérapies anti-cancéreuses seront de plus en plus individualisées.

Au terme de ce travail, les trois vaccins ADN encodant les TERT canine, féline ou hybride présentent un intérêt dans le cadre d'une future utilisation en cancérologie vétérinaire. Leur développement mérite d'être poursuivi.

Nous avons constaté que les relations entre le système immunitaire et les tumeurs évoluent au cours du temps : s'il participe d'abord à l'élimination des cellules cancéreuses, il exerce une pression de sélection qui favorise la prolifération de cellules tumorales moins immunogènes qui échappent à son contrôle. Nous avons ensuite pu voir que la connaissance de plus en plus précise de ces interactions a permis de développer des immunothérapies anti-tumorales, tant chez l'homme, que chez l'animal, qui pour certaines présentent une efficacité cliniquement prouvée (comme le vaccin Oncept® chez le chien). Au sein des immunothérapies figurent les vaccins anti-cancers dont l'efficacité dépend à la fois de l'antigène vaccinal choisi et du mode d'administration de l'antigène. La TERT, de par son rôle dans la tumorigénèse, et de par son spectre d'expression semble être un antigène vaccinal de choix pour un vaccin anti cancer. Enfin, les vaccins ADN présentent une grande plasticité, une grande facilité d'utilisation et de fabrication qui font de cette technologie une modalité vaccinale d'avenir. En définitive, les données scientifiques publiées semblent en faveur du développement d'un vaccin ADN utilisant la TERT comme antigène vaccinal.

Expérimentalement, nous avons montré que les trois vaccins ADN encodant les TERT canine, féline et hybride sont fonctionnels et présentent une immunité *in-vitro* après transfection de cellules de mammifères. Utilisé *in-vivo* en modèle murin, ces vaccins sont immunogènes et induisent une réponse T cytotoxique spécifique de cibles cellulaires exprimant des antigènes de la TERT canine, féline ou hybride. Enfin nous avons montré qu'il existe, chez le chien sain, une population de lymphocyte T sécréteur d'IFN-γ spécifique de la TERT canine, que la vaccination serait donc susceptible de cibler.

Le développement de ces candidats vaccin mérite donc d'être poursuivi afin de vérifier dans un premier temps leur immunogénicité puis leur efficacité chez des animaux malades en mono- ou poly-thérapie avec d'autres agents anti-cancéreux. Enfin, compte-tenu des similarités entre les tumeurs humaines et animales, l'utilisation de ces vaccins chez les animaux domestiques pourrait servir de référence à un éventuel traitement similaire chez l'homme.

Thèse de M. Gabriel CHAMEL

Docteur Ludovic FREYBURGER responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

Le Directeur général
VetAgro Sup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON SUD
69495 PIERRE BENITE CEDEX
Professeur Frédéric BERARD

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 12 JUIN 2013

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F. N'GUYEN

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON

Bibliographie

Bibliographie

Aboud, S., C. Nilsson, et al. (2010). "Strong HIV-specific CD4+ and CD8+ T-lymphocyte proliferative responses in healthy individuals immunized with an HIV-1 DNA vaccine and boosted with recombinant modified vaccinia virus ankara expressing HIV-1 genes." Clin Vaccine Immunol **17**(7): 1124-31.

Advani, R., A. Forero-Torres, et al. (2009). "Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **27**(26): 4371-7.

Akhtar, N., M. L. Padilla, et al. (2004). "Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model." Neoplasia **6**(2): 106-16.

Antony, G. K. and A. Z. Dudek (2010). "Interleukin 2 in cancer therapy." Curr Med Chem **17**(29): 3297-302.

Armbruster, B. N., S. S. Banik, et al. (2001). "N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo." Mol Cell Biol **21**(22): 7775-86.

Autexier, C. and N. F. Lue (2006). "The structure and function of telomerase reverse transcriptase." Annu Rev Biochem **75**: 493-517.

Babiuk, S., M. E. Baca-Estrada, et al. (2004). "Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines." J Biotechnol **110**(1): 1-10.

Barry, M. A., W. C. Lai, et al. (1995). "Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization." Nature **377**(6550): 632-5.

Basak, S., S. Eck, et al. (2000). "Colorectal cancer vaccines: antiidiotypic antibody, recombinant protein, and viral vector." Ann N Y Acad Sci **910**: 237-52; discussion 252-3.

Beatty, G. L., E. G. Chiorean, et al. "CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans." Science **331**(6024): 1612-6.

Bergman, P. J., M. A. Camps-Palau, et al. (2006). "Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center." Vaccine **24**(21): 4582-5.

Bergman, P. J., J. McKnight, et al. (2003). "Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial." Clin Cancer Res **9**(4): 1284-90.

Bernhardt, S. L., M. K. Gjertsen, et al. (2006). "Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study." Br J Cancer **95**(11): 1474-82.

Besser, M. J., R. Shapira-Frommer, et al. (2010). "Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients." Clin Cancer Res **16**(9): 2646-55.

Blackburn, E. H. (2001). "Switching and signaling at the telomere." Cell **106**(6): 661-73.

Bosoy, D. and N. F. Lue (2001). "Functional analysis of conserved residues in the putative "finger" domain of telomerase reverse transcriptase." J Biol Chem **276**(49): 46305-12.

Brahmer, J. R., C. G. Drake, et al. "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." J Clin Oncol **28**(19): 3167-75.

Brave, A., K. Ljungberg, et al. (2005). "Multigene/multisubtype HIV-1 vaccine induces potent cellular and humoral immune responses by needle-free intradermal delivery." Mol Ther **12**(6): 1197-205.

Brennan, S. K., Q. Wang, et al. (2010). "Telomerase inhibition targets clonogenic multiple myeloma cells through telomere length-dependent and independent mechanisms." PLoS One **5**(9).

Brockley, L. K., M. A. Cooper, et al. (2013). "Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival." N Z Vet J **61**(1): 25-31.

Brunsvig, P. F., S. Aamdal, et al. (2006). "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol Immunother **55**(12): 1553-64.

Burk, R. L. (1996). "Radiation therapy in the treatment of oral neoplasia." Vet Clin North Am Small Anim Pract **26**(1): 155-63.

Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-86.

Calarota, S., G. Bratt, et al. (1998). "Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients." Lancet **351**(9112): 1320-5.

Caputo, A., R. Gavioli, et al. (2003). "Immunization with low doses of HIV-1 tat DNA delivered by novel cationic block copolymers induces CTL responses against Tat." Vaccine **21**(11-12): 1103-11.

Casimiro, D. R., L. Chen, et al. (2003). "Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene." J Virol **77**(11): 6305-13.

Castano, A. P., P. Mroz, et al. (2006). "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity." Nat Rev Cancer **6**(7): 535-45.

Cawood, R., T. Hills, et al. (2012). "Recombinant viral vaccines for cancer." Trends Mol Med **18**(9): 564-74.

Chen, J., F. Fang, et al. (2005). "Protection against influenza virus infection in BALB/c mice immunized with a single dose of neuraminidase-expressing DNAs by electroporation." Vaccine **23**(34): 4322-8.

Clarke, M. F., J. E. Dick, et al. (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Res **66**(19): 9339-44.

Collins, K. (1999). "Ciliate telomerase biochemistry." Annu Rev Biochem **68**: 187-218.

Cong, Y. S., W. E. Wright, et al. (2002). "Human telomerase and its regulation." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 407-25, table of contents.

Conry, R. M., D. T. Curiel, et al. (2002). "Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients." Clin Cancer Res **8**(9): 2782-7.

Corbeil, S., S. E. Lapatra, et al. (1999). "Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout oncorhynchus mykiss using DNA vaccines." Dis Aquat Organ **39**(1): 29-36.

Cronin, M., R. M. Stanton, et al. (2012). "Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: a review." Cancer Gene Ther **19**(11): 731-40.

Davis, B. S., G. J. Chang, et al. (2001). "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays." J Virol **75**(9): 4040-7.

de Fornel, P., F. Delisle, et al. (2007). "Effects of radiotherapy on pituitary corticotroph macrotumors in dogs: a retrospective study of 12 cases." Can Vet J **48**(5): 481-6.

de Visser, K. E., A. Eichten, et al. (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev Cancer **6**(1): 24-37.

Denis-Mize, K. S., M. Dupuis, et al. (2003). "Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles." Cell Immunol **225**(1): 12-20.

Di Lorenzo, G., M. Ferro, et al. (2012). "Sipuleucel-T (Provenge(R)) for castration-resistant prostate cancer." BJU Int **110**(2 Pt 2): E99-104.

Dikmen, Z. G., G. C. Gellert, et al. (2005). "In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor." Cancer Res **65**(17): 7866-73.

Dikmen, Z. G., W. E. Wright, et al. (2008). "Telomerase targeted oligonucleotide thio-phosphoramidates in T24-luc bladder cancer cells." J Cell Biochem **104**(2): 444-52.

Djojosubroto, M. W., A. C. Chin, et al. (2005). "Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma." Hepatology **42**(5): 1127-36.

Domchek, S. M., A. Recio, et al. (2007). "Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance." Cancer Res **67**(21): 10546-55.

Donnelly, J. J., A. Friedman, et al. (1995). "Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus." Nat Med **1**(6): 583-7.

Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-4.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.

Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-48.

Dupuis, M., K. Denis-Mize, et al. (2000). "Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice." J Immunol **165**(5): 2850-8.

Egan, M. A., S. Megati, et al. (2006). "Rational design of a plasmid DNA vaccine capable of eliciting cell-mediated immune responses to multiple HIV antigens in mice." Vaccine **24**(21): 4510-23.

Ehrlich, P. (1909). "Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung." Ned. Tijdschr. Geneeskd.(5): 273-290.

Erdman, S. E., J. J. Sohn, et al. (2005). "CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice." Cancer Res **65**(10): 3998-4004.

Estrela-Lima, A., M. S. Araujo, et al. (2010). "Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates." BMC Cancer **10**: 256.

FACCO (2012). "http://www.facco.fr/-Population-animale-.".

Farnie, G. and R. B. Clarke (2006). "Breast stem cells and cancer." Ernst Schering Found Symp Proc(5): 141-53.

Feltquate, D. M., S. Heaney, et al. (1997). "Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization." J Immunol **158**(5): 2278-84.

Finocchiaro, L. M. and G. C. Glikin (2008). "Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma." Gene Ther **15**(4): 267-76.

Funakoshi, Y., H. Nakayama, et al. (2000). "Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors." Vet Pathol **37**(2): 177-83.

Gallimore, A. M. and A. K. Simon (2008). "Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity." Oncogene **27**(45): 5886-93.

Gentilini, F. (2010). ""Masitinib" is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors." J Vet Intern Med **24**(1): 6; author reply 7.

Ghiringhelli, F., C. Menard, et al. (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." Cancer Immunol Immunother **56**(5): 641-8.

Gill, V. L., P. J. Bergman, et al. (2008). "Use of imiquimod 5% cream (Aldara) in cats with multicentric squamous cell carcinoma in situ: 12 cases (2002-2005)." Vet Comp Oncol **6**(1): 55-64.

Golay, J., L. Zaffaroni, et al. (2000). "Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis." Blood **95**(12): 3900-8.

Greider, C. W. (1991). "Telomerase is processive." Mol Cell Biol **11**(9): 4572-80.

Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-13.

Griffiths, T. R. (2012). "Current perspectives in bladder cancer management." Int J Clin Pract.

Grosenbaugh, D. A., A. T. Leard, et al. (2011). "Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor." Am J Vet Res **72**(12): 1631-8.

Gryaznov, S., K. Pongracz, et al. (2001). "Telomerase inhibitors--oligonucleotide phosphoramidates as potential therapeutic agents." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **20**(4-7): 401-10.

Gryaznov, S. M., S. Jackson, et al. (2007). "Oligonucleotide conjugate GRN163L targeting human telomerase as potential anticancer and antimetastatic agent." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **26**(10-12): 1577-9.

Hampel, V., B. Schwarz, et al. (2007). "Adjuvant immunotherapy of feline fibrosarcoma with recombinant feline interferon-omega." J Vet Intern Med **21**(6): 1340-6.

Hanada, T., T. Kobayashi, et al. (2006). "IFNgamma-dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice." J Exp Med **203**(6): 1391-7.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Harbers, S. O., A. Crocker, et al. (2007). "Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance." J Clin Invest **117**(5): 1361-9.

Harley, C. B. (1991). "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?" Mutat Res **256**(2-6): 271-82.

Hartikka, J., V. Bozoukova, et al. (2001). "Vaxfectin enhances the humoral immune response to plasmid DNA-encoded antigens." Vaccine **19**(15-16): 1911-23.

Harvey, H. J., E. G. MacEwen, et al. (1981). "Prognostic criteria for dogs with oral melanoma." J Am Vet Med Assoc **178**(6): 580-2.

Hayday, A. C. (2009). "gamma delta T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response." Immunity **31**(2): 184-196.

Hellstrom, K. E. and I. Hellstrom (2003). "Therapeutic vaccination with tumor cells that engage CD137." J Mol Med (Berl) **81**(2): 71-86.

Henson, J. D., A. A. Neumann, et al. (2002). "Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells." Oncogene **21**(4): 598-610.

Higuchi, T., M. Shimizu, et al. (2009). "A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth." Cancer Immunol Immunother **58**(8): 1245-55.

Hioki, M., S. Kagawa, et al. (2008). "Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy." Int J Cancer **122**(11): 2628-33.

Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-23.

Hussain, S. P., L. J. Hofseth, et al. (2003). "Radical causes of cancer." Nat Rev Cancer **3**(4): 276-85.

Hutchinson, L. (2010). "Immunotherapy. Significant overall survival advantage for RCC patients treated with autologous tumor lysate vaccine." Nat Rev Clin Oncol **7**(6): 300.

Hwang, E. C., M. S. Lim, et al. (2012). "Generation of potent cytotoxic T lymphocytes against castration resistant prostate cancer cells by dendritic cells loaded with dying allogeneic prostate cancer cells." Scand J Immunol.

Impellizeri, J. A., K. Howell, et al. (2006). "The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation." Vet J **171**(3): 556-8.

Irving, J., Z. Wang, et al. (2004). "Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity." Cancer Gene Ther **11**(3): 174-85.

Jahnke, A., J. Hirschberger, et al. (2007). "Intra-tumoral gene delivery of feIL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: a phase-I study." J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **54**(10): 599-606.

Johnston, K. B., J. M. Monteiro, et al. (2005). "Protection of beagle dogs from mucosal challenge with canine oral papillomavirus by immunization with recombinant adenoviruses expressing codon-optimized early genes." Virology **336**(2): 208-18.

Jones, D. H., S. Corris, et al. (1997). "Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration." Vaccine **15**(8): 814-7.

Jourdier, T. M., C. Moste, et al. (2003). "Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2)." Gene Ther **10**(26): 2126-32.

Kang, M. J., C. K. Kim, et al. (2004). "Skin permeation, biodistribution, and expression of topically applied plasmid DNA." J Gene Med **6**(11): 1238-46.

Kantoff, P. W., C. S. Higano, et al. (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med **363**(5): 411-22.

Karlseder, J., D. Broccoli, et al. (1999). "p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2." Science **283**(5406): 1321-5.

Katz, J. M. and R. G. Webster (1989). "Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs." J Infect Dis **160**(2): 191-8.

Katz, M. H., D. E. Spivack, et al. (2003). "Gene therapy of pancreatic cancer with green fluorescent protein and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion gene expression driven by a human telomerase reverse transcriptase promoter." Ann Surg Oncol **10**(7): 762-72.

Kavanagh, B., S. O'Brien, et al. (2008). "CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion." Blood **112**(4): 1175-83.

Khan, A. S., A. M. Bodles-Brakhop, et al. (2010). "Effects of maternal plasmid GHRH treatment on offspring growth." Vaccine **28**(8): 1905-10.

Khanna, C., C. London, et al. (2009). "Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients." Clin Cancer Res **15**(18): 5671-7.

Kilpatrick, A. M., A. P. Dupuis, et al. (2010). "DNA vaccination of American robins (Turdus migratorius) against West Nile virus." Vector Borne Zoonotic Dis **10**(4): 377-80.

Kim, N. W., M. A. Piatyszek, et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.

Kim, N. W. and F. Wu (1997). "Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)." Nucleic Acids Res **25**(13): 2595-7.

Kim, Y. S., Y. J. Kim, et al. (2010). "CD40-targeted recombinant adenovirus significantly enhances the efficacy of antitumor vaccines based on dendritic cells and B cells." Hum Gene Ther **21**(12): 1697-706.

Kitamura, T., K. Kometani, et al. (2007). "SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion." Nat Genet **39**(4): 467-75.

Klinman, D. M., G. Yamshchikov, et al. (1997). "Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines." J Immunol **158**(8): 3635-9.

Komata, T., Y. Kondo, et al. (2001). "Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter." Cancer Res **61**(15): 5796-802.

Kondo, N., M. Tsukuda, et al. (2010). "Antitumor effects of telomelysin in combination with paclitaxel or cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma." Oncol Rep **23**(2): 355-63.

Kujawski, M., M. Kortylewski, et al. (2008). "Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice." J Clin Invest **118**(10): 3367-77.

Kurzman, I. D., E. G. MacEwen, et al. (1995). "Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin." Clin Cancer Res **1**(12): 1595-601.

Kutzler, M. A. and D. B. Weiner (2008). "DNA vaccines: ready for prime time?" Nat Rev Genet **9**(10): 776-88.

Langowski, J. L., X. Zhang, et al. (2006). "IL-23 promotes tumour incidence and growth." Nature **442**(7101): 461-5.

Lasoudris, F., C. Cousin, et al. "IL4I1: an inhibitor of the CD8(+) antitumor T-cell response in vivo." Eur J Immunol **41**(6): 1629-38.

Liao, J. C., P. Gregor, et al. (2006). "Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma." Cancer Immun **6**: 8.

Lin, J., R. Jin, et al. (2008). "Nucleolar localization of TERT is unrelated to telomerase function in human cells." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2169-76.

Lingner, J., J. P. Cooper, et al. (1995). "Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?" Science **269**(5230): 1533-4.

Lingner, J., T. R. Hughes, et al. (1997). "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase." Science **276**(5312): 561-7.

Liu, J. P., W. Chen, et al. (2010). "Telomerase in cancer immunotherapy." Biochim Biophys Acta **1805**(1): 35-42.

Liu, M. A. (2010). "Immunologic basis of vaccine vectors." Immunity **33**(4): 504-15.

Locher, C. P., D. Putnam, et al. (2003). "Enhancement of a human immunodeficiency virus env DNA vaccine using a novel polycationic nanoparticle formulation." Immunol Lett **90**(2-3): 67-70.

Lue, N. F. (2004). "Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it?" Bioessays **26**(9): 955-62.

Lue, N. F. (2005). "A physical and functional constituent of telomerase anchor site." J Biol Chem **280**(28): 26586-91.

Lue, N. F., Y. C. Lin, et al. (2003). "A conserved telomerase motif within the catalytic domain of telomerase reverse transcriptase is specifically required for repeat addition processivity." Mol Cell Biol **23**(23): 8440-9.

Machiels, J. P., R. T. Reilly, et al. (2001). "Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice." Cancer Res **61**(9): 3689-97.

Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-44.

Marian, C. O., S. K. Cho, et al. (2010). "The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth." Clin Cancer Res **16**(1): 154-63.

Martin, J. E., T. C. Pierson, et al. (2007). "A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial." J Infect Dis **196**(12): 1732-40.

Martinuzzi, E., G. Afonso, et al. (2011). "acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses." Blood **118**(8): 2128-37.

Merlo, D. F., L. Rossi, et al. (2008). "Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy." J Vet Intern Med **22**(4): 976-84.

Morrison, W., Ed. (2002). *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management, second edition.*

Nabel, G. J. (2013). "Designing tomorrow's vaccines." N Engl J Med **368**(6): 551-60.

Nahta, R. and F. J. Esteva (2006). "Herceptin: mechanisms of action and resistance." Cancer Lett **232**(2): 123-38.

Nakajima, O., D. Ichimaru, et al. (2009). "Use of telomelysin (OBP-301) in mouse xenografts of human head and neck cancer." Oncol Rep **22**(5): 1039-43.

Nemunaitis, J., A. W. Tong, et al. (2010). "A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors." Mol Ther **18**(2): 429-34.

Nimal, S., A. L. McCormick, et al. (2005). "An interferon gamma-gp120 fusion delivered as a DNA vaccine induces enhanced priming." Vaccine **23**(30): 3984-90.

O'Brien, M. G., R. C. Straw, et al. (1993). "Resection of pulmonary metastases in canine osteosarcoma: 36 cases (1983-1992)." Vet Surg **22**(2): 105-9.

Okano, F. and K. Yamada (2000). "Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line." Anticancer Res **20**(5B): 3411-5.

Oncology,ESVONC.(2012). "http://www.esvonc.org/PetownerbrnbspnbspInformation/tabid/54/Default.aspx."

Onizuka, S., I. Tawara, et al. (1999). "Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody." Cancer Res **59**(13): 3128-33.

Pai Kasturi, S., H. Qin, et al. (2006). "Prophylactic anti-tumor effects in a B cell lymphoma model with DNA vaccines delivered on polyethylenimine (PEI) functionalized PLGA microparticles." J Control Release **113**(3): 261-70.

Paoloni, M. C. and C. Khanna (2007). "Comparative oncology today." Vet Clin North Am Small Anim Pract **37**(6): 1023-32; v.

Park, E. J., J. H. Lee, et al. "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." Cell **140**(2): 197-208.

Pellegrini, M., T. Calzascia, et al. (2009). "Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies." Nat Med **15**(5): 528-36.

Person, R., A. M. Bodles-Brakhop, et al. (2008). "Growth hormone-releasing hormone plasmid treatment by electroporation decreases offspring mortality over three pregnancies." Mol Ther **16**(11): 1891-7.

Peruzzi, D., A. Gavazza, et al. (2010). "A vaccine targeting telomerase enhances survival of dogs affected by B-cell lymphoma." Mol Ther **18**(8): 1559-67.

Ponce, F., J. P. Magnol, et al. (2004). "Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy." Vet J **167**(2): 158-66.

Purcell, M. K., K. M. Nichols, et al. (2006). "Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus." Mol Immunol **43**(13): 2089-106.

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

Rao, S. S., P. Gomez, et al. (2006). "Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model." Vaccine **24**(3): 367-73.

Reddel, R. R. (2003). "Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer." Cancer Lett **194**(2): 155-62.

Robbins, P. F., R. A. Morgan, et al. (2011). "Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1." J Clin Oncol **29**(7): 917-24.

Robert-Guroff, M. (2007). "Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development." Curr Opin Biotechnol **18**(6): 546-56.

Roberts, S. J., B. Y. Ng, et al. (2007). "Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6770-5.

Rusakiewicz, S., M. Dosset, et al. (2010). "Immunogenicity of a recombinant lentiviral vector carrying human telomerase tumor antigen in HLA-B*0702 transgenic mice." Vaccine **28**(38): 6374-81.

Sangro, B., G. Mazzolini, et al. (2004). "Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors." J Clin Oncol **22**(8): 1389-97.

Sato, N., Y. Saga, et al. "Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation." Oncol Rep **28**(5): 1574-8.

Sato, Y., M. Roman, et al. (1996). "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization." Science **273**(5273): 352-4.

Sedman, S. A., M. S. Barbosa, et al. (1991). "The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture." J Virol **65**(9): 4860-6.

Seliger, B., M. J. Maeurer, et al. (2000). "Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth." Immunol Today **21**(9): 455-64.

Shammas, M. A., H. Koley, et al. (2008). "Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo." Leukemia **22**(7): 1410-8.

Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.

Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol **163**(10): 5211-8.

Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-67.

Shore, D. and A. Bianchi (2009). "Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase." EMBO J **28**(16): 2309-22.

Skubitz, K. M. and P. M. Anderson (2000). "Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: a phase I clinical trial." Anticancer Drugs **11**(7): 555-63.

Smyth, M. J., G. P. Dunn, et al. (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." Adv Immunol **90**: 1-50.

Soiffer, R., T. Lynch, et al. (1998). "Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13141-6.

Steitz, T. A. (1999). "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms." J Biol Chem **274**(25): 17395-8.

Stevenson, F. K., D. Zhu, et al. (1995). "Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma." Immunol Rev **145**: 211-28.

Su, Z., J. Dannull, et al. (2005). "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." J Immunol **174**(6): 3798-807.

Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." Journal of Clinical Investigation **117**(5): 1137-1146.

Tagawa, S. T., P. Lee, et al. (2003). "Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma." Cancer **98**(1): 144-54.

Takahashi, H., H. Ogata, et al. (2010). "Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation." Cancer Cell **17**(1): 89-97.

Takai, H., A. Smogorzewska, et al. (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." Curr Biol **13**(17): 1549-56.

Tamura, K., M. Yamada, et al. (2008). "Induction of dendritic cell-mediated immune responses against canine malignant melanoma cells." Vet J **175**(1): 126-9.

Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**(6365): 152-4.

Tangney, M. and C. G. Gahan (2010). "Listeria monocytogenes as a vector for anti-cancer therapies." Curr Gene Ther **10**(1): 46-55.

Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2004). "Immunoregulatory T cells in tumor immunity." Curr Opin Immunol **16**(2): 157-62.

Teske, E., G. R. Rutteman, et al. (1998). "Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE): a randomized clinical trial in dogs with mammary carcinoma." Anticancer Res **18**(2A): 1015-9.

Thomas, L. (1959). "Discussion in cellular and humoral aspects of hypersensitive states." HS Lawrence, ed (New York: Hoeber Harper): 529-532.

Tollefsen, S., M. Vordermeier, et al. (2003). "DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants." Scand J Immunol **57**(3): 229-38.

Tsuda, K., K. Yamanaka, et al. (2011). "Intratumoral injection of Propionibacterium acnes suppresses malignant melanoma by enhancing Th1 immune responses." PLoS One **6**(12): e29020.

U'Ren, L. W., B. J. Biller, et al. (2007). "Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma." J Vet Intern Med **21**(1): 113-20.

Ulmer, J. B., R. R. Deck, et al. (1994). "Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines." Vaccine **12**(16): 1541-4.

Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." Science **259**(5102): 1745-9.

Ulmer, J. B. and G. R. Otten (2000). "Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming." Dev Biol (Basel) **104**: 9-14.

Uyttenhove, C., L. Pilotte, et al. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.

Vail, D. M., E. G. MacEwen, et al. (1995). "Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial." Clin Cancer Res **1**(10): 1165-70.

van der Most, R. G., A. Currie, et al. (2006). "Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity." Cancer Res **66**(2): 601-4.

Vascellari, M., E. Baioni, et al. (2009). "Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats." BMC Vet Res **5**: 39.

von Euler, H., A. Sadeghi, et al. (2008). "Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma." J Immunother **31**(4): 377-84.

Vonderheide, R. H., S. M. Domchek, et al. (2004). "Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes." Clin Cancer Res **10**(3): 828-39.

Waldner, M. J. and M. F. Neurath (2009). "Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development." Semin Immunopathol **31**(2): 249-56.

Wang, B. X., R. Rahbar, et al. (2011). "Interferon: current status and future prospects in cancer therapy." J Interferon Cytokine Res **31**(7): 545-52.

Wang, L., T. Yi, et al. (2009). "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway." J Exp Med **206**(7): 1457-64.

Wang, Q. M., S. H. Sun, et al. (2004). "Epitope DNA vaccines against tuberculosis: spacers and ubiquitin modulates cellular immune responses elicited by epitope DNA vaccine." Scand J Immunol **60**(3): 219-25.

Wang, S., D. J. Farfan-Arribas, et al. (2006). "Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine." Vaccine **24**(21): 4531-40.

Watanabe, K., T. Kawamori, et al. (2000). "COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer." Biofactors **12**(1-4): 129-33.

Weinrich, S. L., R. Pruzan, et al. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT." Nat Genet **17**(4): 498-502.

Weiss, J. M., T. C. Back, et al. (2009). "Successful immunotherapy with IL-2/anti-CD40 induces the chemokine-mediated mitigation of an immunosuppressive tumor microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19455-60.

Wenandy, L., R. B. Sorensen, et al. (2008). "The immunogenicity of the hTERT540-548 peptide in cancer." Clin Cancer Res **14**(1): 4-7.

Wick, M., D. Zubov, et al. (1999). "Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT)." Gene **232**(1): 97-106.

Withrow SJ, V. D., Ed. (2007). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4th Edition*

Wolchok, J. D., A. S. Yang, et al. "Immune regulatory antibodies: are they the next advance?" Cancer J **16**(4): 311-7.

Wright, W. E., M. A. Piatyszek, et al. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." Dev Genet **18**(2): 173-9.

Wright, W. E. and J. W. Shay (1992). "The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization." Exp Gerontol **27**(4): 383-9.

Wu, S., K. J. Rhee, et al. (2009). "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses." Nat Med **15**(9): 1016-22.

Yamada, A., T. Sasada, et al. (2012). "The next generation of peptide vaccines for advanced cancer." Cancer Sci.

Yang, Y., Y. Chen, et al. (2002). "Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function." Exp Cell Res **277**(2): 201-9.

Yazawa, M., M. Okuda, et al. (2001). "Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors." American Journal of Veterinary Research **62**(10): 1539-1543.

Yazawa, M., M. Okuda, et al. (1999). "Measurement of telomerase activity in dog tumors." J Vet Med Sci **61**(10): 1125-9.

Zhou, J. H., B. Tang, et al. (2007). "hTERT-targeted E. coli purine nucleoside phosphorylase gene/6-methylpurine deoxyribose therapy for pancreatic cancer." Chin Med J (Engl) **120**(15): 1348-52.

CHAMEL Gabriel

TITRE : Fonctionnalité, sécurité et immunogénicité de trois nouveaux vaccins ADN encodant la TERT canine, féline ou hybride destinés à un futur usage thérapeutique contre les cancers du chien et du chat

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, *2 juillet 2013*

RESUME : L'augmentation de l'espérance de vie et de la médicalisation des carnivores domestiques ont participé à l'accroissement de l'incidence des cancers pour lesquels les possibilités thérapeutiques sont restreintes et dont l'efficacité est limitée, à ce jour, chez ces espèces. La progression des connaissances concernant l'immunité anti-tumorale et la vaccinologie constitue un terrain favorable à l'élaboration de nouvelles modalités thérapeutiques en oncologie humaine et vétérinaire dont font partie les vaccins thérapeutiques. La TERT, de par sa surexpression dans une grande variété de tumeurs, et sa fonction essentielle à la survie des cellules cancéreuses, constitue une cible de choix pour une immunothérapie tirant profit des avantages biologiques et technologiques des vaccins ADN. Trois plasmides encodant respectivement la TERT canine, féline ou une TERT hybride entre les deux premières ont fait l'objet de cette étude qui a montré la fonctionnalité et l'innocuité de ces trois constructions *in-vitro*, ainsi que leur capacité à induire une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique spécifique en modèle murin. La mise en évidence de clones lymphocytaires T sécréteurs d'IFN-γ spécifiques de la TERT canine dans le sang périphérique d'un chien sain rend la suite du développement de ces vaccins chez les espèces cibles d'autant plus pertinente.

MOTS CLES :
- Cancer
- Immunothérapie
- Télomérase
- Vaccin à l'ADN
- Carnivore domestique

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Frédéric BERARD
1er Assesseur :	Monsieur le Docteur Ludovic FREYBURGER
2ème Assesseur :	Madame le Docteur Frédérique PONCE

DATE DE SOUTENANCE : 2 JUILLET 2013

ADRESSE DE L'AUTEUR :
354 Route des lacs
74400 CHAMONIX MONT-BLANC