



HAL
open science

Etude de tolérance d'un virus oncolytique dérivé du virus de la vaccine armé d'un gène thérapeutique en combinaison à la flucytosine chez des chiens beagles sains

Anaïs Corteyn

► To cite this version:

Anaïs Corteyn. Etude de tolérance d'un virus oncolytique dérivé du virus de la vaccine armé d'un gène thérapeutique en combinaison à la flucytosine chez des chiens beagles sains. Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04780028

HAL Id: dumas-04780028

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04780028v1>

Submitted on 13 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2020

**ÉTUDE DE TOLÉRANCE D'UN VIRUS ONCOLYTIQUE
DÉRIVÉ DU VIRUS DE LA VACCINE ARMÉ D'UN GÈNE
THÉRAPEUTIQUE EN COMBINAISON À LA FLUCYTOSINE
CHEZ DES CHIENS BEAGLES SAINS**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État' de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 16 Juillet 2020

par

Anaïs, Monique, Lucienne CORTEYN

direction de

MAUREY Christelle

et avec la participation en tant qu'invité de

BEGUIN Jérémy

Président du jury :	M. Nicolas DE PROST	Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL
1^{er} Assesseur :	Mme Christelle MAUREY	Maître de Conférences à l'EnvA
2nd Assesseur :	Mme Sophie LE PODER	Professeur à l'EnvA

Liste des membres du corps enseignant



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directrice des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin
Directeurs honoraires : MM. Les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Morailon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint** : Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée - Pr Verwaerde Patrick* <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Léila, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénéac Christelle, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Hoummady Sara, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticien hospitalier
--	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint** : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Maufré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew <p>Rattachée DPASP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
--	--

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint** : Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marnagnac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée <p>* responsable d'unité pédagogique</p>	<p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tirez Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticien hospitalier <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié
--	--

Professeurs émérites : Pr Combrisson Hélène, Pr Enriquez Brigitte, Pr Panthier Jean-Jacques, Pr Paragon Bernard.

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse,

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommage respectueux.

Au Docteur Christelle Maurey-Guenec,

Maitre de conférences à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort,
Pour m'avoir permis de réaliser ce sujet de thèse en assurant sa direction.
Pour votre soutien et vos conseils.
Sincères remerciements.

Au Professeur Sophie Le Poder,

Professeur à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
Pour avoir accepté l'assessorat de ce travail,
Sincères remerciements.

Au Docteur Jérémy Béguin,

Doctorant en cancérologie à l'Ecole nationale vétérinaire d'Alfort,
Pour votre grande disponibilité, votre gentillesse et vos conseils avisés tout le long de la
réalisation de ce travail,
Sincères remerciements.

À tous nos professeurs, cliniciens, résidents et assistants hospitaliers et internes,

Pour votre disponibilité, pédagogie et passion,
Remerciements.

A mes parents,

Pour leur soutien indéfectible depuis tant d'années.

A toute ma famille et mes amis,

Qui ont toujours été présents pour me soutenir. Vous m'avez permis de devenir ce que je
suis aujourd'hui.

Tables des matières

Liste des acronymes et abréviations	5
Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Introduction	11
Première partie : étude bibliographique	13
I) La virothérapie oncolytique	14
A. Caractéristique des processus tumoraux.....	14
a) Une autosuffisance en facteur de croissance	16
b) Perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance	16
c) Echappement à l'apoptose	17
d) Potentiel de réplication illimitée	17
e) Angiogenèse tumorale.....	17
f) Capacité d'invasion des tissus et métastases.....	18
B. Ciblage de la tumeur.....	18
a) Un ciblage naturel.....	19
b) Un ciblage permis par des modifications génétiques.....	19
C. Mode d'action oncolytique	23
a) Oncolyse directe	23
b) Induction d'une immunité tumorale	24
c) Gènes thérapeutiques	25
d) Variation de la néoangiogenèse	26
e) Potentialisation des techniques actuelles.....	26
D. Limite de la virothérapie oncolytique.....	27
a) Un risque de réponse inflammatoire systémique	27
b) La pénétration cellulaire	27
c) La réponse immunitaire contre le virus oncolytique.....	28
E. Inquiétude et danger potentiel	29

II)	Le virus de la vaccine TG6002 : un bon candidat	29
A.	Un poxviridae	29
a)	Un grand génome	29
b)	Une structure variable	30
c)	Le cycle réplcatif	31
d)	Des virus oncolytiques potentiels.....	32
e)	Les limites des poxvirus	33
B.	Le virus de la vaccine	33
a)	Spécificités de la vaccine.....	33
b)	Mode d'action	34
c)	Données cliniques actuelles.....	34
C.	Modifications génétiques apportées à ce virus pour donner le TG6002.....	35
a)	La délétion de la thymidine kinase et de la ribonucléotide réductase	36
b)	Ajout du gène FCU 1	36
c)	Association avec le 5FC.....	37
d)	Données pré-cliniques	44
D.	Autres vecteurs oncolytiques dérivés du virus de la vaccine.....	45
III)	Les différents vecteurs viraux oncolytiques.....	46
A.	Les virus naturellement oncolytiques.....	47
a)	Les Réovirus.....	47
b)	Les Parvoviridae.....	50
c)	Les Rhabdoviridae.....	52
d)	Les Paramyxoviridae	55
e)	Les Circoviridae.....	57
B.	Virus génétiquement modifiés.....	57
a)	Les adénovirus.....	57
b)	Les herpesvirus	60
c)	Les Poxviridae.....	63
d)	Les Rétroviridae.....	64
IV)	Les tumeurs canines : un bon modèle en médecine translationnelle.....	69
A.	Des modèles cellulaires et murins incomplets.....	69
B.	Des tumeurs canines semblables aux tumeurs humaines.....	69

a)	Environnement tumoral.....	70
b)	Incidence.....	70
c)	Système immunitaire.....	71
d)	Examen histologique.....	71
e)	Comportement biologique.....	72
f)	Réponse au traitement conventionnel.....	72
g)	Aspect génétique.....	73
h)	Vieillessement.....	74
C.	Les limites du modèle canin.....	75
	Deuxième partie : étude expérimentale.....	77
I)	Objectifs.....	78
II)	Considération éthique des effets secondaires.....	79
III)	Matériel et Méthodes.....	80
A.	Matériel.....	80
a)	Etude de tolérance du TG6002.....	80
b)	Etude de tolérance du 5-FC.....	81
B.	Méthodes.....	82
a)	Injections intramusculaires uniques de TG6002.....	82
b)	Administration répétée de 5-FC.....	85
c)	Injections intramusculaires répétées de TG6002.....	87
C.	Critère d'évaluation de la tolérance.....	90
a)	Examen clinique.....	90
b)	Numération formule sanguine.....	90
c)	Paramètres biochimiques.....	91
d)	Lésions cutanées.....	92
D.	Evaluation de l'excrétion virale.....	92
E.	Evaluation de la concentration sérique en 5-FC.....	93
IV)	Résultats.....	93
a)	Injection du TG6002 en dose unique.....	93
b)	Administration répétée du 5-FC.....	95
c)	Injection du TG6002 en doses répétées.....	101
V)	Discussion.....	104
A.	Effets secondaire constatés au cours des études.....	104

a) Troubles digestifs lors d'injections répétées de TG6002	104
b) Les lésions cutanées lors d'administration répétée de 5-FC.....	105
B. Limites du modèle choisi	106
a) Effets secondaires.....	106
b) Nombre d'animaux	106
c) Excrétion virale	107
G. Etude pharmacocinétique du 5-FC	107
Conclusion	108
Bibliographie.....	109
Annexes	117

Liste des acronymes et abréviations

5- FdUMP : 5-fluorodésoxyuridine monophosphate

5-FC : 5-flucytosine

5-FU : 5-fluorouracil

5-FUH2 : 5-fluorodihydrouracile

5-FUPA : acide 5-fluorouréidopropionique

5-FUTP : 5-fluorouridine triphosphate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

ALAT : Alanine aminotransférase

ALVAC : Virus de la variole du canari recombinant

AMaROC : cancers Animaux Modèles pour la Recherche en Oncologie Comparée

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAV : Virus de l'anémie du poulet

CEF : Chicken Embryo Fibroblast

CEV : Cell-associated virion

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COX-2 : Cyclo-Oxygénase-2

DPD : Dihydropyrimidine déhydrogénase

DSENO : Dose sans effet nocif observé

dUMP : Désoxyuridine monophosphate

EEV: Extracellular enveloped virion

EGFR : Endothelial Growth Factor Receptor

FBAL : α -fluoro β -alanine

FGF : Fibroblast Growth Factor

GCV : Ganciclovir

GCVm : Ganciclovir monophosphate

GCVt : Ganciclovir triphosphate

HCC : Carcinome hépatocellulaire

hIFN β : interféron- β humain

HSV-1 : Herpès Simplex virus 1

HVEM : Médiateur d'entrée des Herpèsvirus

IEV : Intracellular envelopped virion

IFN : Interferon

IHC : Detection immunohistochimique

IL : Interleukine

IMV : Intracellular mature virion

kpb : kilo paire de base

LTR : Longue répétition terminale

MCH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

MCHC : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

MCV : Volume globulaire moyen

MYXV : Virus de la myxomatose génétiquement modifié

NARA : anticorps anti-réovirus neutralisant

NDV : Virus de la maladie de Newcastle

NIH : National Cancer Institute

PAL : phosphatases alcalines

PKR : Protéine Kinase R

pRb : retinoblastoma protein

RR : Ribonucléotide Réductase

TAA : Antigène tumoraux

TBP : Thymidine BiPhosphate

TCID₅₀ : Tissu culture infectious dose

TIR : Séquence terminale inversée répétée

TK : Thymidine Kinase

TMP : Thymidine MonoPhosphate

TS : Thymidilate synthétase

TTP : Thymidine TriPhosphate

UFP : Unité formatrice de plage de lyse

USDA : United States Department of Agriculture

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VGf : Virus Growth Factor

VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse

VV : Virus de la vaccine

Liste des figures

Figure 1 : Altérations essentielles de la physiologie des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2000)	15
Figure 2 : Mécanisme de perte de sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance dans les cellules tumorales. (Hanahan et Weinberg, 2000).....	16
Figure 3 : Structure du génome des poxvirus (T. Brennan. 2017)	30
Figure 4 : Structure d'un poxvirus (N. Tarbouriech and al. 2012)	30
Figure 5 : Cycle réplcatif d'un orthopoxvirus (N. Tarbouriech and al. 2012)	32
Figure 6 : Conversion du 5-FC en 5-FU par le gène FCU1	36
Figure 7 : Lyse cellulaire induite par le 5-FC et le gène FCU1	37
Figure 8 : Structure chimique de la cytosine (a), de la flucytosine (b) et du 5-fluorouracil (c). (A. Vermes and al. 2000).....	37
Figure 9 : Entrée et action du 5-FU dans les cellules infectées par un agent fongique. (A. Vermes and al. 2000)	38
Figure 10 : Anabolisme du 5-FU (T. Aparicio and al. 2002)	40
Figure 11 : Catabolisme du 5-FU (T. Aparicio and al. 2002)	41
Figure 12 : Le cycle réplcatif des réovirus (Lemay G. 2002)	48
Figure 13 : Exemple d'organisation génomique d'un parvovirus (Deleu et al. 2002)	50
Figure 14 : Cycle réplcatif des parvovirus (Deleu et al. 2002).....	51
Figure 15 : Structure des rhabdovirus (A. Decoster, JC. Lemahieu , H. Peigue-Lafeuille, 2005)	53
Figure 16 : Cycle réplcatif des rhabdovirus (A. Decoster and al. 2005)	53
Figure 17 : Structure des paramyxovirus (M S. Harrson and al. 2010)	55
Figure 18 : Schéma du cycle réplcatif des paramyxovirus. (M S. Harrson and al. 2010).	56
Figure 19 : Cycle réplcatif d'un adénovirus (Hakarainen et Hemminki, 2005).	58
Figure 20 : Structure d'un herpesvirus (S. Collot-teixeira, 2003).	60
Figure 21 : Cycle réplcatif d'un herpesvirus (S. Collot-teixeira, 2003)	61
Figure 22 : Cycle réplcatif des rétrovirus. (Hakkarainen et Hemminki, 2005).	65
Figure 23 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 des chiens 1 et 4	84
Figure 24 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 du chien 2	84
Figure 25 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 du chien 3	84
Figure 27: Protocole d'étude de tolérance du 5-FC.....	86
Figure 26 : Protocole d'étude de tolérance du TG6002 en injections répétées.	89
Figure 28 : Variation de poids de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002	94
Figure 30: Evolution du poids des chiens lors de l'étude de tolérance du 5-FC	95
Figure 31: Evolution des lésions cutanées faciales du chien 1.....	97
Figure 32 : Evolution des lésions cutanées faciales du chien 2	97
Figure 33 : Evolution des lésions cutanées faciales du chien 3	98
Figure 45 : Evolution de la concentration sérique en 5-FC dans les 12h suivant la première administration	99
Figure 46 : Evolution de la concentration sérique lors des 12h suivant une prise	100
Figure 29 : Variation de poids de l'ensemble des chiens lors des injections répétées de TG6002	102

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Caractéristique biologique des virus majoritairement utilisés dans le cadre des études sur les virus oncolytiques. (M. Szelechowski and al. 2005)</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 2: Avantages et désavantages des différents virus dans le traitement des cancers canins (S.Patil and al. 2012).</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 3 : Sélection d'essais cliniques récemment publiés en virothérapie oncolytique. (S. Turnbull and al. 2015).</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 4 : Poids des chiens inclus dans l'étude</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 5 : Poids des chiens inclus dans l'étude de tolérance du 5-FC.....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 6 : Dosage des injections intramusculaires simples de TG6002</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 7 : Volume de TG6002 injecté lors des injections répétées</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 8 : Quantité de 5-FC donnée lors des traitements biquotidiens dépendante du poids des chiens.</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 9 : Quantité de 5-FC données bi-quotidiennement aux chiens en fonction de leur poids initial.</i>	<i>85</i>
<i>Tableau 10 : Effet secondaire entraînant l'arrêt de l'administration du 5-FC.....</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 11: Date d'apparition des lésions cutanées lors d'administration répétée de 5-FC</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 12 : Diagnostic différentiel des dermatites d'interface.....</i>	<i>105</i>

Introduction

Au 21^{ème} siècle, le cancer est un problème de santé publique majeur. En 2018, en France métropolitaine, le nombre de nouveaux cas de cancers (toutes localisations confondues) est estimé à près de 382 000 d'après l'Institut National de Veille Sanitaire. Le nombre de décès est estimé à près de 157 400 par ans. Dans le monde, ce sont plusieurs dizaines de millions de nouveaux cas qui sont diagnostiqués chaque année. Le cancer est une pathologie de plus en plus fréquente et dévastatrice tant en médecine humaine que vétérinaire.

Le terme cancer caractérise toute prolifération cellulaire illimitée avec des cellules capables d'échapper à l'apoptose et de disséminer dans d'autres organes.

Les thérapies actuelles sont basées sur la chirurgie, la radiothérapie et des traitements cytostatiques et cytotoxiques tels que la chimiothérapie, les thérapies ciblées. Cependant, certains de ces traitements, tels que la chimiothérapie, ont une sélectivité imparfaite pour les cellules tumorales. Leurs effets cytotoxiques sur les cellules de l'organisme en forte division entraînent de nombreux effets secondaires tels que de la diarrhée, des vomissements, une anorexie, ou des anomalies hématologiques. Leur gravité est souvent un facteur limitant de la dose à laquelle peut être administrée le traitement.

La recherche de nouveaux traitements plus efficaces, plus spécifiques et mieux tolérés est donc nécessaire. Afin de limiter les effets secondaires, la cancérologie se tourne vers le développement de « stratégie ciblée », c'est-à-dire de traitements ciblant uniquement les cellules tumorales tels que la virothérapie oncolytique.

Le premier lien entre virus et cancers date du siècle dernier, lors de l'observation de régression de tumeurs après une vaccination ou une infection virale (M. Szelechowski et A. Saïb, 2005). En 1973, une étude rapporte des cas de rémissions spontanées de lymphome chez des enfants ayant eu la rougeole. (HC Mota, 1973) Depuis les années 2000, de nombreuses recherches et essais cliniques ont lieu et se révèlent prometteurs. La virothérapie oncolytique est un traitement qui permettrait un ciblage des cellules cancéreuses par le virus, ce qui permettrait de limiter les effets secondaires. La thérapie virale permettrait aussi la potentialisation des techniques actuelles et notamment le renforcement de l'action de la chimiothérapie.

De nombreuses similitudes entre les tumeurs canines et humaines font du chien un bon modèle d'étude en médecine translationnelle. En effet, les anomalies histologiques, la génétique, le comportement biologique et la réponse aux traitements des cancers canins sont très proches de l'Homme. A la différence du modèle murin, le chien possède un système immunitaire compétent et semblable au notre, ce qui est primordiale dans la

virothérapie. Le chien est également soumis au même environnement que son maître, les agents physico-chimiques et potentiels cancérigènes sont communs. Enfin, le vieillissement plus rapide du chien permet l'étude des processus cancéreux dans son ensemble sur un délai plus court qu'en médecine humaine. Toutes ces similitudes et avantages permettent la réalisation d'essais cliniques vétérinaires en virothérapie oncolytique. L'objectif de ces essais est double, d'une part tester l'innocuité et l'efficacité des virus oncolytiques utilisables chez l'Homme, et d'autre part, permettre des avancées en médecine vétérinaire.

Les caractéristiques de la virothérapie oncolytique seront tout d'abord détaillées de manière à pouvoir ensuite étudier les différents virus possibles ainsi que les études en cours sur ceux-ci. La présentation du TG6002 et de la 5-flucytosine permettra ensuite l'analyse de l'étude de tolérance de la flucytosine (5-FC) et celle du TG6002 chez des chiens beagles sains.

Première partie : étude bibliographique

I) La virothérapie oncolytique

D'après le NIH (National Cancer Institute), la virothérapie oncolytique est définie comme un traitement utilisant un virus oncolytique. Celui-ci infecte ou se réplique spécifiquement dans les cellules tumorales, entraînant la lyse cellulaire par différents mécanismes ; les cellules saines n'étant pas touchées.

Pour se faire, des virus ayant une réplication conditionnelle sélective sont utilisés. Ils conservent leur capacité à se répliquer, à condition que la réplication se fasse spécifiquement dans les cellules tumorales et que celle-ci aboutisse à leur lyse.

A. Caractéristique des processus tumoraux.

L'étude des génotypes de cellules cancéreuses montre six altérations essentielles de la physiologie des cellules de mammifères dans les cellules cancéreuses (figure 1). Ces modifications leur confèrent leur malignité (Hanahan et Weinberg, 2000) :

- Une autosuffisance en signaux de croissance
- Une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance
- Un échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose)
- Un potentiel de réplication illimité
- Une angiogenèse tumorale importante
- Une capacité d'invasion tissulaire et de formation de métastases

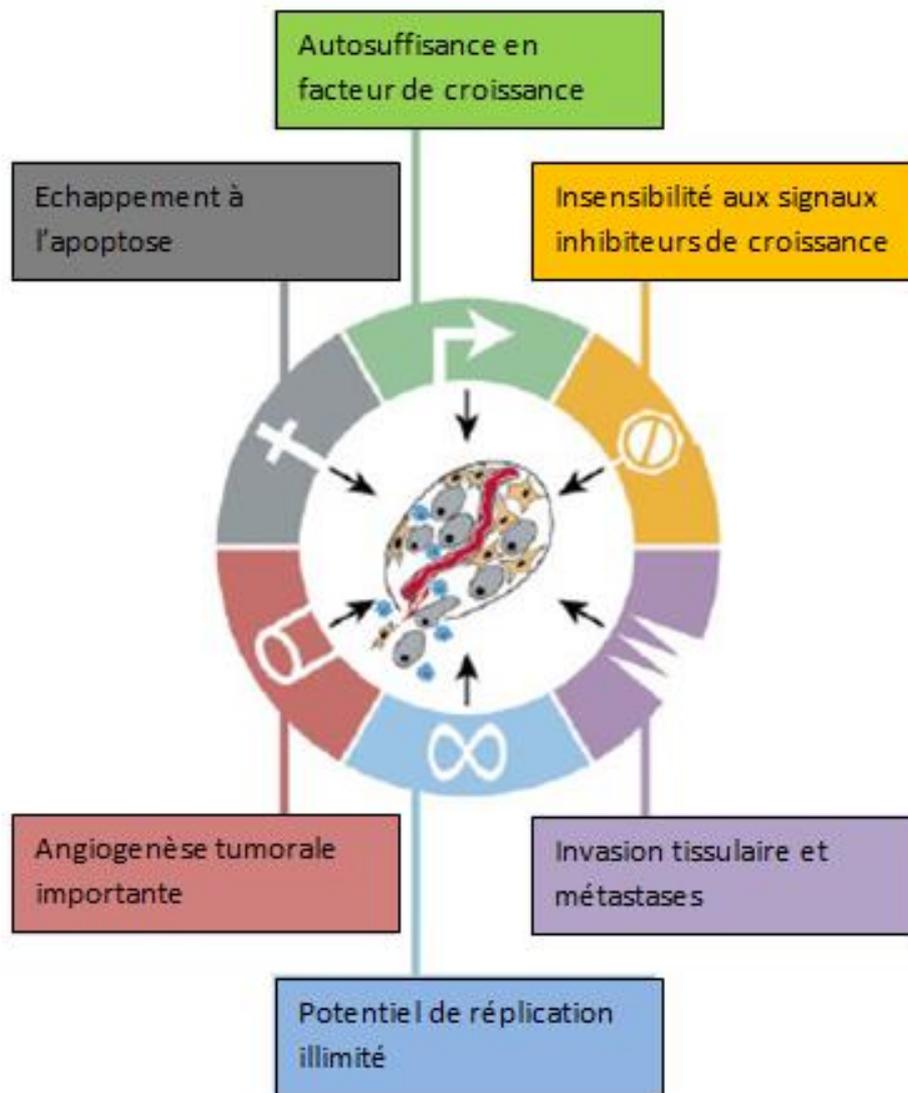


Figure 1 : Altérations essentielles de la physiologie des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2000)

De plus, l'accès aux cellules tumorales est souvent rendu plus difficile à cause d'anomalies des mécanismes de présentation des antigènes tumoraux et du micro environnement tumoral.

Les tumeurs étant issues de cellules de l'organisme, le corps ne reconnaît pas de danger et n'active donc pas le système immunitaire. L'absence de production de médiateurs du système immunitaire (cytokines) et de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) couplée à l'expression des antigènes du soi à la surface cellulaire rend les cellules cancéreuses peu immunogènes.

a) Une autosuffisance en facteur de croissance

Les cellules saines nécessitent des signaux de croissance pour pouvoir passer de la quiescence à l'entrée dans un cycle cellulaire mitotique. Dans les cellules cancéreuses, des oncogènes peuvent mimer ou produire des signaux de croissance tel que Ras et Alb. Ces signaux sont libérés de manière continue et sans stimulation environnementale, ce qui permet une prolifération cellulaire constante. (Hanahan et Weinberg, 2000)

b) Perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance

Dans les tissus sains, de nombreux signaux antiprolifératifs maintiennent la cellule au stade de quiescence et d'homéostasie (figure 2). Dans les cellules cancéreuses, la perte de sensibilité aux signaux de croissance est principalement due à la voie de la « retinoblastoma protein » (pRb) ou de ses deux homologues p107 et p130. En effet, dans le cycle cellulaire normal, quand la pRb est hypophosphorylée, elle bloque les facteurs de transcription de la protéine E2F qui permet le passage de la phase G1 (repos) à la phase S (mitose). L'hypophosphorylation de la pRb empêche donc la réplication cellulaire. L'altération de la pRb entraîne la transcription puis la libération de E2F et donc la prolifération cellulaire. (Hanahan et Weinberg, 2000)

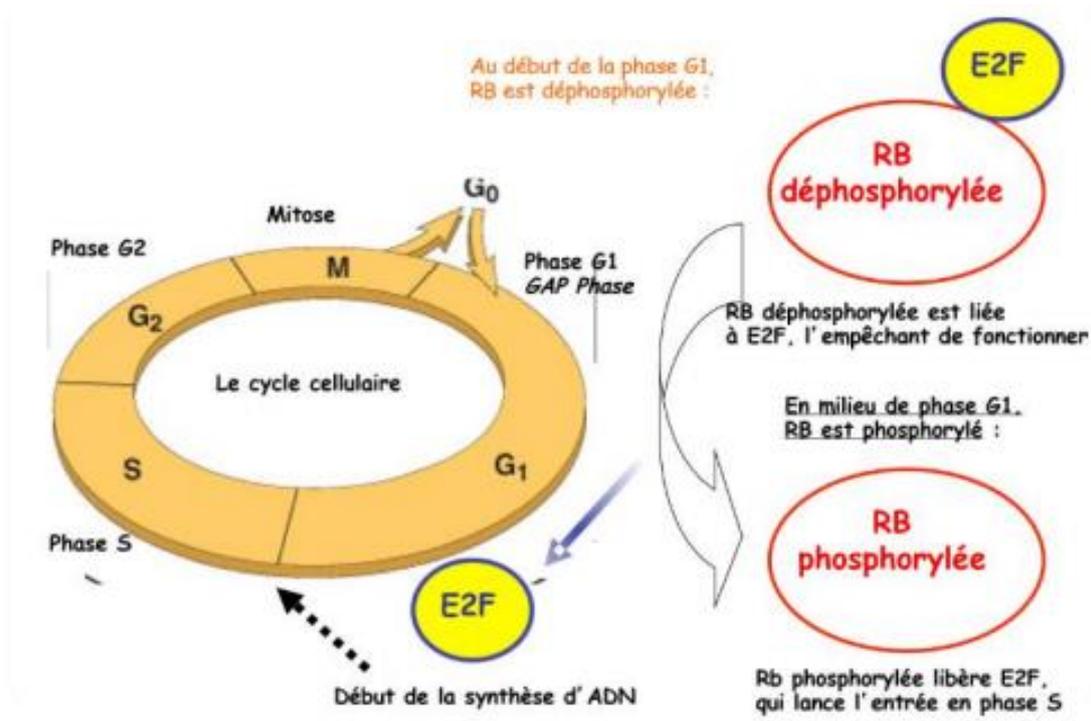


Figure 2 : Mécanisme de perte de sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance dans les cellules tumorales. (Hanahan et Weinberg, 2000)

c) Echappement à l'apoptose

L'échappement à la mort programmée est la signature des cellules cancéreuses et favorise grandement leur développement. Dans les cellules saines, le ligand Fas-L se lie au récepteur cellulaire Fas et entraîne sa destruction. Certaines cellules tumorales peuvent avoir un récepteur « decoy receptor » surexprimé possédant une affinité supérieure pour le Fas-L mais n'entraînant pas l'apoptose. Le ligand Fas-L est donc détourné de son récepteur spécifique et n'entraîne plus la mort de la cellule.

Une autre voie anti-apoptotique majeure (modifiée dans plus de 50% des cancers humains) est la mutation du gène suppresseur de tumeur *p53*. Il joue un rôle clé dans la régulation pro-apoptotique ; son inactivation empêche l'apoptose de la cellule.

Dans les lymphomes, la surexpression de *bcl-2* par translocation d'un gène inhibiteur de l'apoptose favorise la prolifération cellulaire tout en augmentant l'échappement à l'apoptose. (Hanahan et Weinberg, 2000)

d) Potentiel de réplication illimitée

Les cellules saines de mammifères possèdent intrinsèquement et en autonomie une limite de multiplication (60 à 70 cycles cellulaires). Cette limite est indépendante du contact avec d'autres cellules ou molécules et a lieu par raccourcissement progressif des télomères au cours des cycles cellulaires successifs. Si la longueur des télomères est trop raccourcie, la cellule rentre en apoptose. 85 à 90% des cellules tumorales réussissent à maintenir la taille de leurs télomères en sur exprimant la télomérase, enzyme rajoutant des nucléotides au télomère. (Hanahan et Weinberg, 2000)

e) Angiogenèse tumorale

L'oxygène et les nutriments apportés par la vascularisation sont nécessaires au fonctionnement et à la survie cellulaire. La croissance tumorale nécessite donc une forte angiogenèse possible par la sécrétion de facteurs tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor) ou le FGF1/2 (acidic and basic fibroblast growth factors) par les cellules cancéreuses. (Hanahan et Weinberg, 2000)

f) Capacité d'invasion des tissus et métastases

Les tumeurs se caractérisent souvent par des masses envahissant les tissus adjacents et pouvant entraîner le développement de tumeurs secondaires à distance de la tumeur primitive, appelées métastases. Cette migration cellulaire peut se faire par voie sanguine ou lymphatique.

La dissémination se déroule en plusieurs étapes :

1. Prolifération cellulaire locale
2. Angiogenèse permettant d'assurer la nutrition de la tumeur primitive
3. Interaction des cellules tumorales avec les parois des vaisseaux grâce au détachement de certaines d'entre elles : la perte d'adhérence intercellulaire est due à l'altération de la cadhérine E.
4. Infiltration des vaisseaux : les cellules rentrent dans le sang (ou dans la lymphe) en traversant la lame basale et la paroi endothéliale. Ces cellules tumorales deviennent alors des « embolus tumoraux » capables d'être transportés par le sang.
5. Transport des embolus jusqu'à la zone cible
6. Adhérence à la paroi vasculaire ou lymphatique de certaines cellules tumorales grâce la modification de l'expression de leurs intégrines. Puis extravasation cellulaire à travers l'endothélium et la lame basale.
7. Entrée au sein d'un nouveau tissu grâce à la surexpression de protéases.
8. Établissement d'un nouveau microenvironnement local et prolifération cellulaire aboutissant à la formation de métastases.

Toutes ces modifications des cellules tumorales permettent le ciblage des tumeurs par les virus oncolytiques.

B. Ciblage de la tumeur

L'une des vérifications majeures à réaliser avant l'utilisation clinique de la virothérapie oncolytique est le ciblage des cellules tumorales. Celui-ci garantit l'innocuité du virus sur les cellules saines et l'infection des cellules tumorales. Ce tropisme peut être inné comme pour les réovirus, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le virus de la rougeole ou acquis par modifications génétiques comme pour les adénovirus ou le virus de la vaccine. (S Patil and al. 2012)

Cette spécificité des cellules tumorales peut avoir lieu à diverses étapes du cycle viral notamment lors de l'entrée du virus dans les cellules hôtes et de sa multiplication.

a) Un ciblage naturel

Certains virus se répliquent préférentiellement dans les cellules tumorales.

Les parvovirus, par exemple, ont un génome simple brin et ne codant pas pour l'ADN polymérase. Le cycle viral nécessite donc une ADN polymérase cellulaire présente majoritairement dans les cellules peu différenciées et en division. Contrairement à certains virus, les parvoviridae ne peuvent pas mener des cellules en quiescence en phase S. Les parvovirus ont donc un tropisme naturel pour les cellules peu différenciées en division, ce qui est le cas des cellules tumorales.

Les réovirus et le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ont un tropisme naturel pour les cellules ayant un défaut dans la voie des interférons (IFN) et de la protéine kinase R (PKR). En effet, le VSV est très sensible à l'inhibition du cycle cellulaire entraîné par l'interféron α . De même les réovirus se répliquent préférentiellement dans les cellules où la protéine Ras est active. Cette protéine est active de manière naturelle dans 30% des tumeurs. Elle permet l'inactivation de la PKR et donc la synthèse de protéine virale (Ces mécanismes seront développés par la suite).

Cependant, l'effet oncolytique des virus sauvages, qu'il s'agisse de réovirus, de parvovirus ou du VSV, ne permet pas une régression totale et irréversible de la tumeur. Il est souvent limité par la réponse immunitaire de l'hôte, qu'elle soit acquise suite au traitement ou de manière préalable. En effet, 50 à 80 % des adultes sont séropositifs pour le parvovirus humain B19 et plus de 50 % pour le réovirus humain. Le recours à la biologie moléculaire est donc nécessaire pour améliorer les propriétés oncolytiques de virus naturellement oncotropiques. Les modifications génétiques peuvent également permettre d'assigner des propriétés oncolytiques à des virus qui n'en avaient pas naturellement. (M. Szelechowski A. Saïb, 2005)

b) Un ciblage permis par des modifications génétiques

- Ciblage spécifique de l'entrée du virus dans la cellule

Les cellules cancéreuses sur-expriment un certain nombre de récepteurs à leurs surfaces. Ces récepteurs peuvent être la cible des virus. La technique de ciblage consiste à modifier les protéines de surface des virus oncolytiques afin de présenter des peptides différents. Ces peptides permettent de cibler les récepteurs spécifiques présents uniquement à la surface des cellules tumorales. Des études récentes ont permis de déterminer des promoteurs spécifiques de tissus comme la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) pour les cancers ovariens et gastriques. Ces découvertes permettent d'augmenter le ciblage des virus oncolytiques lors de leurs entrées dans les cellules. (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

Une seconde technique de ciblage vise les antigènes tumoraux (TAA) surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Des anticorps bi-fonctionnels reconnaissent d'une part une protéine de l'enveloppe virale et d'autre part des TAAs. (S. Foillard, 2008).

Le ciblage lors de l'entrée est principalement utilisé chez les adénovirus. (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

- Ciblage lors de la multiplication virale

Le ciblage des cellules tumorales peut aussi être permis par une réplication du virus possible uniquement dans les cellules cancéreuses.

La suppression de certains gènes viraux indispensables à la réplication dans les cellules saines mais facultatifs à la réplication dans les cellules tumorales est la manière principale de rendre le virus spécifique des cellules cancéreuses. Ces gènes codent, en général, pour des protéines interagissant avec les voies de signalisation caractéristiques des cellules cancéreuses.

Plusieurs voies peuvent être utilisées lors du ciblage :

- Voies IFN/PKR

La suppression du gène viral B18R codant pour une protéine qui neutralise les interférons de type I (IFN) permet de produire des virus oncolytiques très spécifiques de tumeur. En effet, les IFN sont des protéines aux rôles multiples intervenant notamment en première ligne dans la défense immunitaire anti-virale. L'expression de la protéine kinase R (PKR) est induite par les IFN lors d'infection virale. Cette protéine se lie à l'ADN viral et entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation à la traduction EIF-2 α . Une fois phosphorylée, cette protéine devient inactive. L'inactivation de ce facteur d'initiation à la traduction empêche le recrutement de l'ARNt et donc la traduction des ARN en protéines. La suppression du gène viral B18R entraîne donc l'inactivation de EIF-2 α et par conséquent inhibe la synthèse protéique et la réplication virale dans les cellules saines. Les IFN entraînent également l'apoptose des cellules infectées. Environ 70 à 75% des cellules cancéreuses sont déficientes dans la voie des IFN. La suppression du gène B18R permet une réplication virale uniquement dans les cellules cancéreuses déficitaires en interférons. (S. Patil and al. 2012)

- Voies anti-apoptotiques p53

Lors d'infections virales, les voies apoptotiques entraînent normalement une mort cellulaire des cellules infectées de manière à empêcher la réalisation du cycle viral et la libération de nouveaux virions. Au cours de leur évolution, les virus ont développé de nombreuses stratégies et acquis de nombreux gènes tel que E1A et E1B afin d'antagoniser l'apoptose cellulaire chez les cellules infectées. Les cellules cancéreuses ayant des mécanismes bloquant l'apoptose, la délétion en gènes anti-apoptotiques E1A et E1B viraux entraîne une spécificité du virus pour les cellules tumorales. Ce mécanisme est décrit chez les adénovirus, le virus de la vaccine et les herpesvirus. (S. Patil and al. 2012)

- Délétion de la thymidine kinase

La thymidine kinase (TK) est une enzyme appartenant à la voie de la phosphorylation de la pyrimidine ; elle est présente dans le génome cellulaire et le génome viral. Elle catalyse la transformation de la thymidine monophosphate (TMP) en thymidine biphosphate (TBP) puis triphosphate (TTP).

Selon les réactions $ATP + TMP \leftrightarrow ADP + TBP$ et $ATP + TBP \leftrightarrow ADP + TTP$

La thymidine triphosphate est un précurseur de l'ADN, nécessaire à sa fabrication et sa réplication. La thymidine kinase est donc une enzyme nécessaire à la réplication cellulaire mais aussi virale.

La concentration en thymidine kinase cellulaire dépend fortement de l'état mitotique de celle-ci. En effet, les cellules en prolifération contiennent beaucoup plus de TK. La délétion du gène viral de la thymidine kinase rend donc la réplication virale préférentielle dans les cellules en mitose. (K. Guse and al. 2017)

- Délétion en ribonucléotide réductase

Le ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme intervenant dans une réaction d'oxydo-réduction. Elle catalyse l'étape limitante de la synthèse de désoxyribonucléotides di ou triphosphates à partir de ribonucléotide di ou triphosphate. Cette enzyme contrôle donc la concentration cellulaire en désoxyribonucléotides phosphates. Les désoxyribonucléotides phosphates étant les précurseurs de l'ADN, le ribonucléotide triphosphate est essentiel pour la synthèse et la réparation de l'ADN. La RR est donc indispensable pour le cycle viral. Les virus délétés en ribonucléotide réductase ne peuvent donc se multiplier que dans les cellules ayant une forte concentration en RR.

La concentration cellulaire du RR dépend du cycle cellulaire. En effet, la concentration en RR est importante lors de la phase S et faible en G0. De plus, on observe une concentration cellulaire en ribonucléotide réductase supérieure dans les cellules tumorales.

La délétion virale en ribonucléotide réductase permet donc le ciblage des cellules cancéreuses. (H. Petrowsky and al. 2001)

- Délétion du gène de facteur de croissance

Un autre gène assez souvent délété chez le virus de la vaccine est celui codant pour le facteur de croissance de ce virus (VGF).

Le VGF, exprimé précocement durant le cycle viral, est sécrété et assimilé comme un ligand de l'EGFR (Endothelial growth factor receptor). Cette liaison stimule la sortie du G0 des cellules avoisinantes ; ce qui facilite la propagation du virus au sein des tissus sains.

Sa délétion permet d'une part d'atténuer la virulence du vecteur recombinant chez les cellules saines et d'autre part d'améliorer le ciblage des cellules en division.

La double délétion (TK-/VGF-) permet alors d'obtenir un effet synergique de ciblage et d'atténuation. (R M. Buller and al. 1988)

- Modification structurale

Les modifications génétiques virales permettent aussi une dégradation des cellules tumorales par leur structure anormale. Une modification génétique d'un seul acide aminé chez le virus de la maladie de Newcastle (NDV) peut entraîner des modifications des protéines de fusion permettant la formation de grands *syncytia* multinucléés dans les cellules cancéreuses. Ces syncytia augmentent la propagation virale et la destruction cellulaire. L'efficacité et la réplication virale dans les cellules anormales peuvent aussi être augmentées par la digestion de la matrice extracellulaire tumorale. Celle-ci peut être réalisée par des protéases ou des hyaluronidases. En effet, il a été prouvé que la matrice extracellulaire tumorale ralentit fortement la distribution et l'efficacité des agents oncolytiques moléculaires et cellulaires. (S. Patil and al. 2012)

- Utilisation de promoteurs spécifiques de tumeurs

Une autre stratégie permettant une réplication virale spécifique est l'utilisation de promoteurs spécifiques de tumeurs. Ces promoteurs ont une activité fortement augmentée dans les cellules cancéreuses. Si les gènes viraux nécessaires à la réplication virale sont sous contrôle de ces promoteurs, les virus deviennent spécifiques des cellules tumorales.

C. Mode d'action oncolytique

Comme expliqué précédemment, un virus oncolytique infecte, se réplique et lyse uniquement les cellules tumorales.

Pour cela, on utilise des virus ayant une répllication conditionnelle sélective, c'est-à-dire qu'ils conservent leur capacité à se répliquer, à condition que la répllication se fasse spécifiquement dans les cellules tumorales et que celle-ci aboutisse à la leur lyse.

La lyse des cellules cancéreuses permet une libération et une diffusion massive des virions nouvellement formés. Ces virions vont ensuite infecter les cellules tumorales voisines permettant une destruction massive des cellules au sein de la tumeur. L'auto-amplification locale et la capacité de multiplication de la dose initiale injectée sont les effets thérapeutiques propres aux virus oncolytiques.

Un virus oncolytique idéal doit comporter plusieurs caractéristiques (G. Wollmann *et al.*, 2012) :

- Un mécanisme bien défini de sélectivité tumorale,
- Un fort potentiel cytolytique avec très peu ou aucune toxicité sur des cellules saines,
- Une distribution systémique possible,
- Un cycle de répllication et de propagation intratumorale rapide,
- Une possibilité de modifications génétiques,
- Une fabrication et une production en grande quantité,
- Un contrôle par des antiviraux en cas de propagation indésirable,
- Une stabilité génétique,
- Une absence d'immunité préexistante,
- Une stimulation de l'immunité anti-tumorale.

Ces virus peuvent donc agir de plusieurs manières : lyse cellulaire, activation et accentuation de la réponse immunitaire anti-tumorale, augmentation de la sensibilité aux thérapies conventionnelles.

a) Oncolyse directe

Certains virus sont naturellement attirés par les cellules tumorales. Ce tropisme est dû aux modifications génétiques et cellulaires permettant à ces cellules une croissance continue et un statut d'immortel. La virothérapie oncolytique s'appuie sur ce principe pour permettre aux virus d'infecter uniquement les cellules tumorales ce qui permet une lyse préférentielle des cellules cancéreuses.

Plusieurs moyens d'oncolyse sont possibles :

- Le cycle viral lytique classique peut conduire à la lyse cellulaire permettant la libération de milliers de virions. Cette multiplication du nombre de virions à chaque cycle cellulaire entraîne une auto-amplification de l'activité lytique au sein de la tumeur et finie par entraîner l'activation du système immunitaire ou la destruction de toutes les cellules tumorales avoisinantes.

- Certaines protéines virales peuvent être toxiques et entraîner l'apoptose de la cellule tumorale lorsqu'elles s'accumulent. Ces protéines sont essentiellement des protéines non structurales et leur mode d'action exact n'est pas encore décrit.

b) Induction d'une immunité tumorale

Les virus oncolytiques peuvent aussi agir en activant la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique ou non. Les cellules cancéreuses ayant des mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'organisme atteint, il est intéressant d'étudier ce mécanisme.

Il existe plusieurs manières d'induire une immunité anti-tumorale comme l'utilisation d'oncolysats, restes de débris de cellules tumorales infectées par un virus oncolytique puis lysées, ou la présentation d'antigènes supplémentaires à la surface des cellules tumorales.

Sinkovics et Cassel utilisent pour la première fois dans les années 1970 des oncolysats (respectivement souche PR8 du virus influenza A et souche 73T du virus de la maladie de Newcastle) en préparation thérapeutique. Ces études montrent que les oncolysats semblent induire une réponse immunitaire humorale orientée contre les antigènes viraux et les antigènes tumoraux révélés. Une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique est donc permise par l'infection virale des cellules cancéreuses.

Une immunité anti-tumorale spécifique peut aussi être induite par certaines protéines virales rétablissant l'immunogénicité cellulaire. Par exemple, dans une cellule, les protéines endogènes normales ou pathologiques (mutées ou virales) sont reconnues et dégradées par le protéasome 26s en peptides servant d'épitopes. Ces épitopes vont être repérés par les lymphocytes T CD8+ et les molécules de CMH I. Une fois activés, les lymphocytes vont permettre l'élimination des cellules anormales.

Récemment, Todo et son équipe ont montré que la suppression du gène $\alpha 47$, inhibiteur des transporteurs de la présentation d'antigène, permet également de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette modification génétique augmente ainsi significativement

l'efficacité du virus (étude sur l'herpesvirus G47Δ, actuellement en essai clinique de phase I). (Todo and al. 2008)

L'activation d'une immunité anti-tumorale spécifique, par ces deux mécanismes, permet :

- non seulement une régression tumorale par destruction des cellules cancéreuses
- mais aussi une protection contre les éventuelles rechutes tumorales à long terme.

c) Gènes thérapeutiques

La capacité des virus à entrer facilement dans les cellules hôtes permet de les employer comme des vecteurs pour transférer du matériel génétique et utiliser le fonctionnement cellulaire pour produire leurs propres protéines et ADN viral.

Cette capacité permet de limiter la réplication d'un virus dans les cellules tumorales grâce à la biologie moléculaire.

L'insertion de transgène permet non seulement d'améliorer la spécificité tumorale au virus oncolytique mais aussi de conférer une immunogénicité aux cellules cancéreuses pour stimuler la réponse immune anti-tumorale. L'insertion de divers gènes codant pour des cytokines dans des virus oncolytiques montre que les interleukines IL-4, IL-10, IL-18 ou GM-CSF peuvent stimuler la réponse immune anti-tumorale. L'interleukine IL-12 semble être la plus efficace à ce jour. (Todo et al. 2008). Ainsi, le virus oncolytique T-Vec (que nous étudierons par la suite), autorisé aux USA, en Europe et en Australie pour le traitement de mélanomes avancés est modifié génétiquement pour exprimer le GM-CSF. L'expression locale de ce gène permet le recrutement et la maturation de cellules dendritiques et de macrophages au sein de la tumeur de manière à stimuler la réponse immune anti-tumorale. (H. Rehman and al. 2016)

Une autre application possible des transgènes est l'application de la thérapie du « gène suicide ». Celle-ci consiste en l'injection d'une pro-drogue inactive dans l'organisme d'une part et le transfert d'un gène codant pour une enzyme permettant la transformation de cette pro-drogue en drogue cytotoxique lysant les cellules la contenant d'autre part.

Les virus oncolytiques peuvent être utilisés pour permettre l'apport du gène codant pour l'enzyme dans les cellules tumorales.

L'un des systèmes de gène suicide les plus prometteurs est basé sur le ganciclovir (GCV), pro-drogue non toxique, et le gène de la thymidine kinase virale. En effet, le ganciclovir est transformé en ganciclovir monophosphate (GCVm) grâce à cette enzyme. Le ganciclovir monophosphate subit ensuite une phosphorylation par les kinases cellulaires naturellement présentes pour devenir du ganciclovir triphosphate (GCVt). Ce dernier étant un analogue de la désoxyguanosine triphosphate inhibant l'ADN polymérase ou s'insérant dans l'ADN, il met ainsi fin à la réplication et provoque la destruction de la cellule. L'activité de ce gène suicide

TK/GCV a été montré *in vivo* chez des animaux atteints par différents types de cancers : carcinomes vésicaux (W. Tang *and al.* 2009) , métastases hépatiques (K. Kakinoki *and al.*, 2010) et gliomes (F. Staquicini *and al.*, 2011).

Le 5-flucytosine (5-FC) est également une pro-drogue prometteuse, pouvant être convertie en 5-fluorouracil (5-FU) par la nitroréductase ou gène de la cytosine désaminase (T. Aparicio *and al.* 2002). Nous développerons par la suite ce gène suicide très largement utilisé en chimiothérapie canine.

d) Variation de la néoangiogenèse

La néoangiogenèse tumorale est une cible prometteuse. Il a récemment été démontré que le virus de la stomatite vésiculeuse infecte et détruit directement la vascularisation tumorale *in vivo*, laissant la vascularisation normale intacte. De même, les virus oncolytiques génétiquement modifiés peuvent également prévenir la néoangiogenèse, conduisant la cellule cancéreuse à la nécrose.

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est une protéine qui joue un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale. Le virus de la vaccine codant pour la protéine anti-VEGFR-1 permet une diminution de la néoangiogenèse au site tumoral et inhibe donc la croissance tumorale. (S Patil *and al.* 2012)

e) Potentialisation des techniques actuelles

La plupart des tumeurs répondent mieux à une stratégie combinant plusieurs thérapies comparées à une monothérapie.

Par exemple, lors des essais cliniques l'ONYX-015, un adénovirus génétiquement modifié pour pouvoir se répliquer uniquement dans les cellules présentant un déficit en *p53* (auquel nous nous intéresserons par la suite), s'est révélé beaucoup plus efficace lorsqu'il est combiné à de la chimiothérapie à base de cisplatine et de 5-fluorouracil (auquel nous nous intéresserons par la suite). En effet, seul, l'ONYX-015 ne permettait pas de régression significative de la taille des tumeurs alors que, couplé à la chimiothérapie, des régressions allant jusqu'à 50% de la taille de la tumeur ont pu être observées. (Hakarainen et Hemminki, 2005).

De même, la mise sur le marché de l'H101 , un adénovirus recombinant connu sous le noms déposé de ONCORIN® dont nous parlerons par la suite, est autorisée contre les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou uniquement s'il est couplé avec de la chimiothérapie.

Le couplage d'une chimiothérapie avec une virothérapie oncolytique permet de diminuer les doses de chimiothérapie sans diminuer l'efficacité du traitement. La combinaison de ces

deux thérapies simples peut donc diminuer la toxicité et les effets secondaires de la chimiothérapie permettant ainsi une amélioration du confort de vie des patients.

D. Limite de la virothérapie oncolytique

a) Un risque de réponse inflammatoire systémique

En 1999, Jesse Gelsinger, a reçu, par perfusion dans l'artère hépatique, un adénovirus génétiquement modifié dans le cadre d'un essai clinique pour une maladie génétique rare se résumant à une carence en ornithine transcarbamylase. Moins de 24 heures après l'administration, ce jeune de 18 ans a développé un syndrome de réponse inflammatoire systémique et une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), suivie d'une défaillance multi-organique. Il est mort quatre jours plus tard.

Cette toxicité a été observée de manière moins sévère, lors d'un autre essai avec un adénovirus, également administré par perfusion dans l'artère hépatique. Le vecteur viral était l'Onyx-015 en association avec du 5-FU chez des patients atteints de métastases hépatiques d'un cancer colorectal. Dans cette étude de phase II, un patient a développé une réaction inflammatoire systémique, une insuffisance hépatique et des taux élevés de cytokine pro-inflammatoire IL-6. Il y avait aussi un décès possible lié au traitement dans la phase I d'un essai clinique du virus de la stomatite vésiculeuse avec une insertion de gène IFN. Un patient atteint de cancer colorectal a développé un syndrome hépato-rénal et est décédé 13 jours après le début du traitement.

Ces exemples illustrent certaines difficultés du développement de produits immunothérapeutiques, en particulier la variabilité inter-patients et l'aspect imprévisible de la réponse immunitaire. De manière globale, dans le traitement par la virothérapie oncogénique, les effets secondaires graves restent cependant peu nombreux. (S. Turnbull, 2015)

b) La pénétration cellulaire

La faible pénétration du virus dans les masses tumorales solides est un défi pour une virothérapie efficace. En effet, la propagation lente du virus dans les tumeurs solides peut être une limitante et détermine le résultat de la thérapie. Une hypothèse consiste à dire que la propagation virale au sein de la tumeur est corrélée à la taille de celui-ci (par exemple environ 200 nm du virus de la vaccine et environ 90 nm pour l'adénovirus). Récemment, Altomonte et son équipe ont montré qu'une seule modification des acides aminés de la protéine de fusion du virus de la maladie de Newcastle a grandement amélioré la fusogénicité d'un virus recombinant. Cette mutation permet la formation de grands

syncytiums multinuclées détruisant les cellules tumorales et permettant la propagation du virus tout au long de la masse tumorale. (J. Altomonte *and al.* 2010)

La propagation intratumorale et l'efficacité des virus oncolytiques sont également améliorées par la digestion de la matrice extracellulaire tumorale médiée par la protéase ou la hyaluronidase. Il a été prouvé que des composants structurels de la tumeur, tels que les collagènes et protéoglycanes entravent la distribution de grandes molécules thérapeutiques et de virus au sein de la tumeur. La dégradation de la matrice extracellulaire par un virus exprimant des protéases matricielles et des collagénases peut donc être une stratégie utile pour renforcer les effets anticancéreux à la fois en médecine humaine et vétérinaire. (PA Netti *and al.* 2000)

c) La réponse immunitaire contre le virus oncolytique

Les réponses immunitaires contre les virus sont des facteurs limitants du déplacement viral par voie vasculaire et de la réplication virale chez les individus immunocompétents. Dans ce contexte, un niveau élevé d'immunité préexistante pour les virus parentaux dans les populations cibles pourrait limiter l'utilisation de virus oncolytiques pour le traitement du cancer. Le rôle des anticorps neutralisants sur les virus oncolytiques injectés par voie veineuse reste cependant à déterminer.

L'utilisation de virus provenant de différents hôtes, tels que la vaccine, pourrait permettre résoudre le problème d'immunité pré-existante.

En effet, délivrer un virus oncolytique aux cellules tumorales via le système circulatoire n'est pas toujours aisé. Les particules virales injectées dans la circulation sanguine sont vulnérables à l'inactivation par les protéines du complément, sont absorbées par le système réticulo-endothélial, sont liées aux globules rouges et neutralisées par les anticorps circulants. Les anticorps sont probablement le facteur le plus limitant lors de traitements. En effet, ils assurent l'immunité durable aux infections répétées. Les anticorps de l'hôte sont probablement la barrière la plus restrictive au traitement, car ils assurent la médiation d'un état d'immunité durable aux infections répétées et leur titre augmente après chaque injection. (M. Lyons *and al.* 2006)

La thérapie à base de cellules porteuses a également fourni des résultats prometteurs pour échapper à l'immunité préexistante. À cet égard, plusieurs types de cellules, telles que des cellules immunitaires, des cellules souches et des cellules tumorales ont été utilisés avec succès comme porteurs de virus oncolytiques aux tumeurs. La livraison spécifique aux tumeurs et l'évasion de l'immunité antivirale préexistante permettent d'augmenter la dose virale locale efficace dans le tissu tumoral et d'ainsi augmenter les effets oncolytiques. (S Patil *and al.* 2012).

E. Inquiétude et danger potentiel

L'utilisation de virus oncolytiques en tant qu'agents thérapeutiques contre le cancer peut éveiller certaines craintes.

En effet, les virus sont naturellement des agents pathogènes, des parasites des cellules eucaryotes et leur injection dans les organes peut se révéler entraîner une nouvelle pathologie. Certains virus peuvent également être oncogènes. Ainsi, la transposition de l'ADN viral du rétrovirus HTLV-1 entraîne chez les humains une leucémie T. (M D. Dodon and al. 2010)

Il ne faut pas oublier que les virus ont une grande capacité à se recombiner, ce qui peut faire réapparaître une souche sauvage du virus vecteur ou créer une nouvelle souche pathogène au sein même de l'hôte. Malgré l'absence de cas de mutations rapportées, l'étude de certaines propriétés garantissant la sécurité du traitement est nécessaire avant l'utilisation de virus oncolytiques. La possession d'un moyen d'éliminer toute trace du virus après le traitement est un point important pour limiter un potentiel danger. L'apport des protéines structurales par des constructions séparées comme chez les rétrovirus ayant des transgènes (dont le mécanisme a été détaillé auparavant) permet également de sécuriser l'utilisation des virus oncolytiques. (M. Szelechowski A. Saïb, 2005)

II) Le virus de la vaccine TG6002 : un bon candidat

A. Un poxviridae

a) Un grand génome

Les poxvirus sont des virus à ADN bicaténaire linéaire dont les extrémités se rejoignent par des séquences terminales inversées répétées (TIR) en forme d'épingle à cheveux (figure 14). Ils possèdent un très grand génome (quasi dix fois plus grand que celui des réovirus) allant de 135kb (pour les parapoxvirus) à 300kb (pour les fowlpox virus). Le virus de la vaccine a un génome de 190kb. Ce génome code pour environ 200 protéines.

Au sein du génome, les gènes sont répartis en 3 catégories :

- Les gènes précoces ou « early » qui codent essentiellement pour les protéines nécessaires à la réplication virale et à l'échappement au système immunitaire
- Les gènes intermédiaires qui codent pour les protéines impliquées dans la régulation des gènes tardifs
- Les gènes tardifs qui codent pour les facteurs de transcription des gènes précoces et les protéines de structure participant à la morphologie et l'assemblage des nouveaux virions.

Le génome des poxvirus contient également des gènes non essentiels au cycle cellulaire près des extrémités ce qui permet d’y insérer des transgènes (jusqu’à 25 kpb) et ainsi d’en faire un vecteur thérapeutique recombinant.

En comparant plusieurs poxvirus, on observe une grande conservation de la région centrale du génome alors que les parties terminales sont plus variables. Ces extrémités codent souvent pour des facteurs viraux immunomodulateurs ou des mécanismes d’échappement au système immunitaire de l’hôte. (N. Tarbouriech and al, 2012)

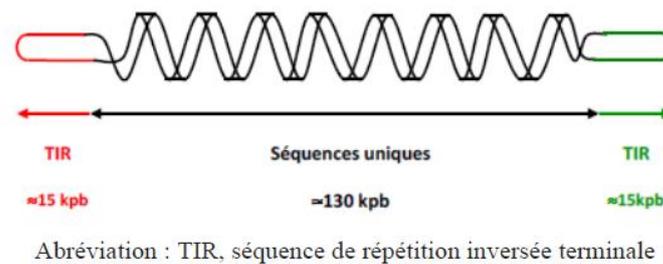


Figure 3 : Structure du génome des poxvirus (T. Brennan. 2017)

b) Une structure variable

Les poxvirus possèdent une enveloppe, une morphologie ovoïde ou en brique et un diamètre allant de 150 nm à 300 nm. Leur structure est dite « complexe » car ils n’ont pas de symétrie icosaédrique ou hélicoïdale comme la majorité des virus, mais présentent une nucléocapside isométrique (figure 15). (N. Tarbouriech and al, 2012)

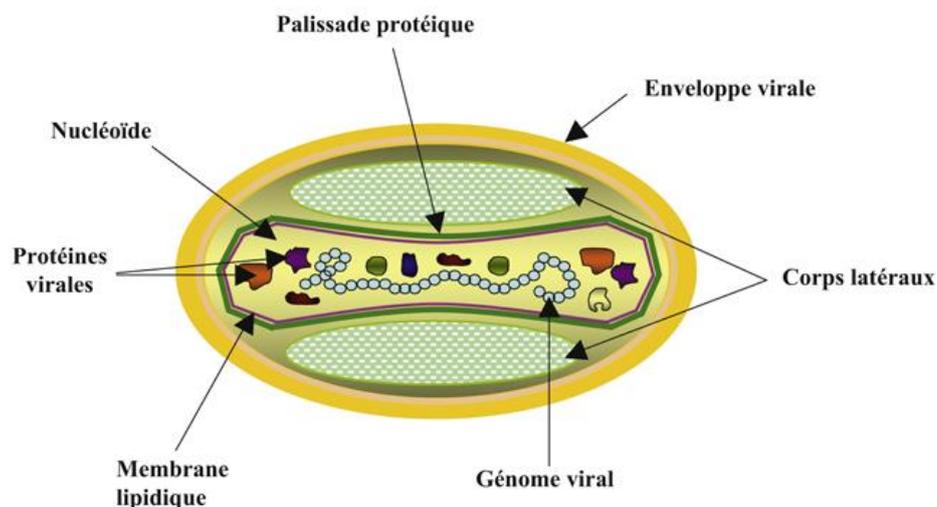


Figure 4 : Structure d'un poxvirus (N. Tarbouriech and al. 2012)

Plusieurs formes de virions sont possibles en fonction du stade du cycle viral et la nature de l'enveloppe :

- IMV (Intracellular mature virions) : Formés dans le cytoplasme et libérés par lyse cellulaire, ils comportent une seule membrane. C'est la forme la plus abondante et la plus résistante du virion.
- IEV (Intracellular envelopped virions) : Issus des IMV après acquisition d'une double enveloppe venant de l'appareil de Golgi ou des endosomes. C'est la forme du virion intracellulaire enveloppé.
- EEV (Extracellular envelopped virions) : Issus des IEV qui perdent leur enveloppe externe après fusion avec la membrane cellulaire. Ils permettent la diffusion à distance chez l'hôte infecté et sont virulents. C'est la forme extracellulaire du virion.
- CEV (Cell-associated virions) : Forme d'EEV retenue à la membrane cellulaire. Ils diffusent dans les cellules grâce à des projections cellulaires dites à queue d'actine. C'est donc une forme du virion enveloppé associée à la cellule.

Les formes IMV et EEV, constituées d'une bicouche lipidique, sont les plus courantes. Leur étude est donc privilégiée en recherche. L'EEV exprime moins d'antigènes viraux à sa surface et peut résister au complément ; ce qui lui permet d'échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte et donc d'atteindre avec plus de facilité les cellules tumorales sans être détruit. (N. Tarbouriech and al, 2012).

c) Le cycle répliatif

Le cycle répliatif des poxvirus (figure 16) commence par la liaison de certaines protéines de l'enveloppe virale aux glycosaminoglycanes et à la laminine de la membrane plasmique. L'entrée du virus dans la cellule permet la libération du nucléoïde viral dans le cytoplasme. Celui-ci va ensuite se placer au niveau de la zone périnucléaire grâce à un réseau de microtubules. Avant la décapsidation, les ARN messagers des gènes précoces sont transcrits par l'ARN polymérase virale puis traduits en protéines. Celles-ci permettent la réplication de l'ADN et en divers immunomodulateurs. Après cette traduction, le nucléoïde est désassemblé ce qui permet la libération de l'ADN génomique dans le cytoplasme. La réplication du génome virale a lieu dans des structures périnucléaires appartenant au cytoplasme de la cellule hôte appelées usines virales et contenant des enzymes essentiellement virales. Cette réplication dure entre 2 et 12 h après l'infection et permet la production de 10 000 génomes ; ce qui donnera environ 5000 virions. En parallèle, les gènes intermédiaires sont transcrits puis traduits ce qui permet l'expression des gènes tardifs

codant pour les protéines structurales. Une fois la réplication et la formation de toutes les protéines achevées, les nouveaux virions sont assemblés dans le cytoplasme et libérés par fusion d'une de leur enveloppe avec la membrane plasmique ou par lyse de la cellule hôte. (N. Tarbouriech and al. 2012)

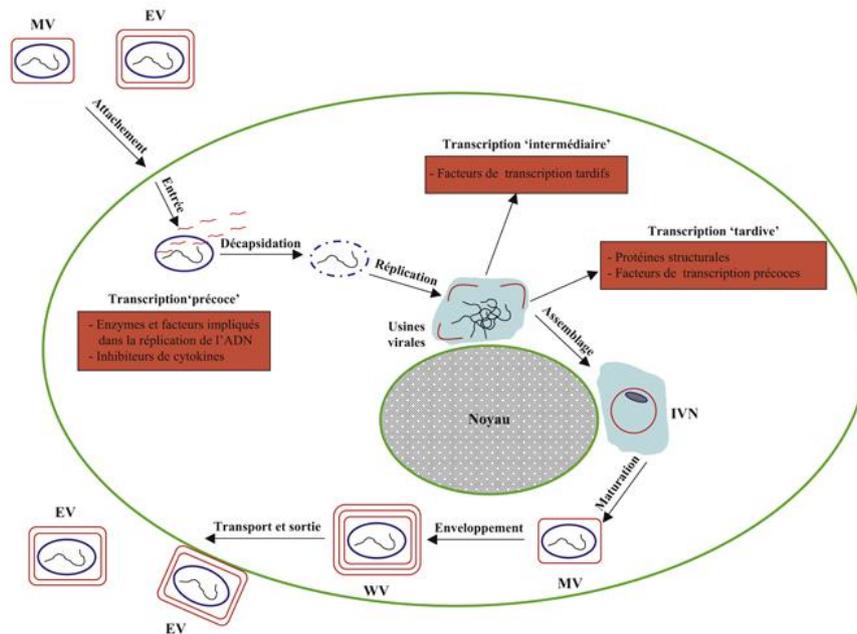


Figure 5 : Cycle réplcatif d'un orthopoxvirus (N. Tarbouriech and al. 2012)

d) Des virus oncolytiques potentiels

Les poxvirus, notamment le virus de la vaccine, présentent des caractéristiques intéressantes à utiliser dans la lutte anticancéreuse (K. Autio et al. 2015) :

- un cycle réplcatif court (8 à 12 heures) et lytique pour le virus de la vaccine (VV),
- une réplication uniquement dans le cytoplasme des cellules évitant tout risque d'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte,
- un génome de grande taille avec des gènes non nécessaires au cycle viral (tyrosine kinase par exemple) et des régions inter-géniques non codantes permettant l'insertion de plusieurs transgènes jusqu'à 25 kb,
- la possibilité d'utiliser des promoteurs précoces, intermédiaires ou tardifs permettant de réguler la transcription des transgènes,

- une stabilité virale, même en dehors du milieu cellulaire, permettant de les conserver longtemps sous forme lyophilisée sans perte significative du pouvoir infectieux. Cette stabilité permet également une facilité de production et de manipulation du virus de la vaccine,
- un tropisme naturel pour les cellules tumorales rapporté pour le virus de la vaccine. Le ciblage des cellules tumorales n'a pas lieu lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte mais lors de sa réplication,
- une sécurité d'utilisation avérée chez l'homme suite à son utilisation dans l'éradication de la variole, ainsi que grâce à l'existence d'un traitement immunologique limitant la réplication du virus de la vaccine : des immunoglobulines de la vaccine (NA. Patel and D. Diven, 2019). Aucune mesure des anticorps circulants ou neutralisants n'a cependant été réalisée dans cette étude.
- une activité oncolytique efficace dans de nombreuses lignées tumorales *in vitro*.

Les poxvirus possèdent également l'avantage d'avoir une capacité naturelle à être transportés par la circulation sanguine. Ce qui facilite une injection par voie intraveineuse afin de cibler des tumeurs diffuses ou non-accessibles. (D. Kirn *et al.* 2009).

e) Les limites des poxvirus

La forte immunogénicité des poxvirus peut-être une limite à leur utilisation. En effet, une forte réponse immunitaire contre le transgène et le virus limite leurs effets *in situ* et limite leur efficacité lors d'une réadministration. Cependant, leur caractère fortement immunogène peut aussi permettre d'augmenter la réponse immunitaire sur les cellules tumorales infectées. Un autre inconvénient du virus de la vaccine est le fait que de nombreux gènes viraux ont encore une fonction inconnue. (M. Szelechowski A. Saïb, 2005).

B. Le virus de la vaccine

a) Spécificités de la vaccine

Le virus de la vaccine fut le premier vaccin utilisé à grande échelle. Il permit d'éradiquer la variole dans le monde.

C'est un orthopoxvirus caractérisé par un génome ADN double brin possédant un très large spectre de cellules hôtes. Il exprime un facteur de croissance soluble qui présente une activité mitogène, facilitant l'infection des cellules voisines. (M. Szelechowski et A. Saïb, 2005).

b) Mode d'action

Le virus de la vaccine possède une action oncolytique grâce à trois mécanismes :

Le premier est l'oncolyse directe : à la suite de l'infection, le virus se réplique et entraîne la lyse des cellules tumorales.

Le second, la mort cellulaire médiée par le système immunitaire. En effet, suite à une infection, la cytolysse des cellules mène à la génération de signaux de dangers cellulaires (DAMPs) et viraux (PAMPs) ainsi qu'à la présentation d'antigènes viraux et tumoraux ce qui induit une réponse immunitaire spécifique contre les cellules tumorales.

Le troisième, l'induction du blocage de la vascularisation tumorale. Ce phénomène semble être médié par des chimiokines et cytokines qui attirent les neutrophiles dans la tumeur, causant une thrombose intravasculaire ainsi qu'une nécrose (H. Kirn *et al.* 2009)

A ces mécanismes s'ajoute l'action des gènes suicides tel que le FCN1, que nous détaillerons par la suite.

c) Données cliniques actuelles

- Étude de l'innocuité

En 2015, JZ. Herbert et son équipe réalisent des essais cliniques du virus de la vaccine délété en gènes codant pour des facteurs de croissance et pour la thymidine kinase sur 17 patients atteints de divers cancers. (JZ Herbert *et al.* 2015)

Un seul effet secondaire grave (grade 3) est observé durant l'étude et peut être relié au VV. Une patiente atteinte d'un cancer du sein a souffert d'une douleur au niveau d'une côte nécessitant une hospitalisation 7 jours après l'injection du virus dans les métastases cutanées. La radiographie n'a montré aucun signe de problème pulmonaire et le scanner aucune tumeur ni infection de la côte. Des analgésiques ont été mis en place et la douleur a rétrogradé en 48h. L'apparition de la douleur corrélée correspond au pic de la réponse inflammatoire et à la disparition du VV en cours de réplifications dans les études précliniques menées sur animaux. (JZ Herbert *et al.* 2015)

D'autres symptômes tardifs (5 à 15 jours post traitement), en lien avec la réponse inflammatoire de l'organisme contre le virus, ont été constatés chez 88% des patients. Ces symptômes (fièvre, malaises, douleurs) étaient légers (grade 1 ou 2) et pouvaient être

associés à la réponse immunitaire contre la VV lors du pic de réplication du virus. (JZ Herbertand al. 2015)

Parmi les effets indésirables, une éruption maculaire, érythémateuse a également été observée 15 jours après l'injection du virus en intratumorale dans les métastases cutanées de cancers du sein. Ces éruptions cutanées étaient auto-résolutives. La biopsie et l'immunohistochimie mettaient en évidence une vascularite non spécifique sans antigènes du virus de la vaccine. (JZ Herbertand al. 2015)

De plus, cette étude a montré l'absence de signe de réplication du VV dans les tissus sains. Aucune trace du virus dans la salive ou l'urine n'a été retrouvée lors des différents prélèvements espacés de l'injection. Ce qui montre que le VV à un faible risque de transmission lors de contacts humains. (JZ Herbertand al. 2015)

- Essai clinique sur des patients atteints de carcinome vésicaux.

L'essai initial de la thérapie virale contre le cancer de la vessie a été mené avec une souche de vaccins issus du virus de la vaccine non modifiée en 2001. L'étude a été réalisée sur seulement 4 patients avec des cancers de la vessie avancés (envahissant les muscles ou les tissus entourant la vessie). Ceux-ci ont été traités avec 3 instillations de virus de la vaccine à des doses maximales de 108 UFP avant la réalisation d'une cystectomie. Cette étude montre l'évolution des patients sous traitement avant la cystectomie et permet une évaluation complète de la tumeur après exposition au virus. En dehors d'une toxicité locale légère (par exemple dysurie), aucun effet secondaire grave lié au virus n'a été signalé. L'évaluation post-résection montre une infiltration inflammatoire, une migration des cellules dendritiques vers le site de l'infection virale, ainsi que des signes d'infection virale dans les cellules saines et les cellules tumorales (LG Gomella and al, 2001).

C. Modifications génétiques apportées à ce virus pour donner le TG6002

L'entrée du virus de la vaccine est possible dans toutes les cellules et se fait par endocytose ou par fusion directe avec la membrane plasmique. Le ciblage des cellules cancéreuses doit donc se faire lors de la réplication virale. Pour ce faire, des modifications génétiques sont apportées au virus. (M. Szelechowski A. Saïb, 2005).

Le TG6002 est issu d'une souche du virus de la vaccine modifié génétiquement.

a) La délétion de la thymidine kinase et de la ribonucléotide réductase

Le TG6002 est délété en gène J2R et I4L, codant pour la thymidine kinase et le ribonucléotide réductase. Comme expliqué précédemment, ces délétions empêchent la synthèse des précurseurs de l'ADN viral. La réplication virale a donc lieu préférentiellement dans les cellules tumorales contenant une forte quantité de thymidine kinase et de ribonucléotide réductase. (P Erbs and al. 2008)

b) Ajout du gène FCU 1

Le gène *FCU1* est un gène suicide codant pour une protéine bifonctionnelle combinant la cytosine désaminase et l'uracil phosphoribosyltransferase. Cette protéine permet la conversion de la pro-drogue 5-flucytosine (5-FC) non toxique en 5-fluorouracile (5-FU) puis en 5-fluorouracil-monophosphate (FUMP) et en 5-fluorodeoxyuridine-monophosphate (FdUMP), des composés cytotoxiques interférant dans la synthèse d'ADN et de protéines.

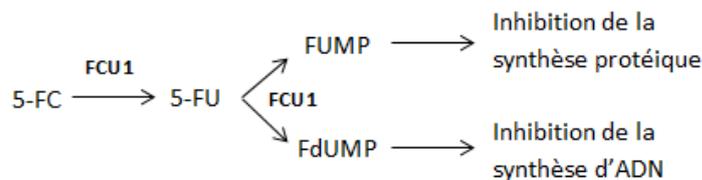


Figure 6 : Conversion du 5-FC en 5-FU par le gène *FCU1*

Dans le TG6002, le gène *FCU1* est inséré dans le locus du gène J2R, sous contrôle du promoteur p11K7.5. *J2R* est un gène délété dans le TG6002 codant la thymidine kinase. (J. Foloppe and al. 2019)

Le 5-FU diffuse passivement à travers les membranes cellulaires, il n'affecte donc pas que les cellules infectées par le virus mais aussi les cellules voisines. Cette transformation du 5-FC en 5-FU par le gène *FCU1* entraîne donc un effet toxique local sur toute la tumeur que les cellules soient infectées par le virus ou non. La transformation étant localisée aux cellules tumorales, cela évite également des effets secondaires systémiques. La réplication virale ainsi que la chimiothérapie locale induisent une lyse tumorale (B. Heinrich and al. 2017).

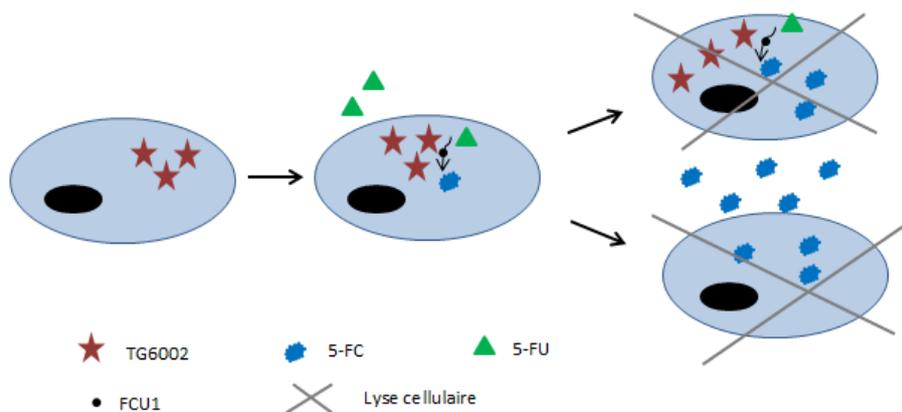


Figure 7 : Lyse cellulaire induite par le 5-FC et le gène FCU1

c) Association avec le 5FC

1. 5-FC

- Mode d'action de la 5-FC

Le 5-flucytosine (5-FC) est un agent antifongique utilisé dans le traitement de mycoses systémiques majeures (candidose, cryptococcose, aspergilose). Il est utilisé en combinaison avec l'amphotéricine B pour éviter les nombreuses résistances auquel il fait face en monothérapie. (A. Vermes and al. 2000)

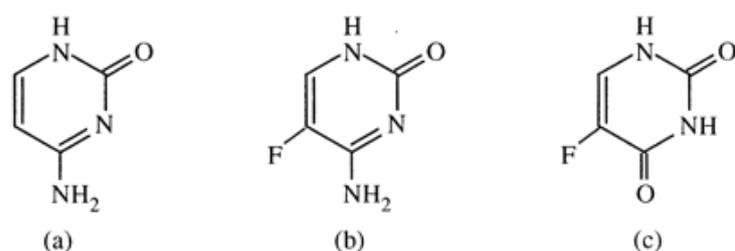


Figure 8 : Structure chimique de la cytosine (a), de la flucytosine (b) et du 5-fluorouracil (c). (A. Vermes and al. 2000)

La 5-flucytosine (5-FC) est une pro-drogue du 5-fluorouracile (5-FU). L'enzyme cytosine désaminase convertit la cytosine en uracile et permet de transformer le 5-FC en 5-FU par désamination (figure 6). Elle est présente chez un grand nombre de champignons et bactéries mais absente des cellules des mammifères.

L'action antifongique du 5-FC est basée sur sa transformation en 5-FU cytotoxique dans les cellules atteintes par la mycose. En effet, cette étape est possible uniquement dans les cellules possédant la cytosine désaminase (figure 7). Le 5-FC permet donc une destruction ciblée des cellules infectées par les champignons ou les bactéries.

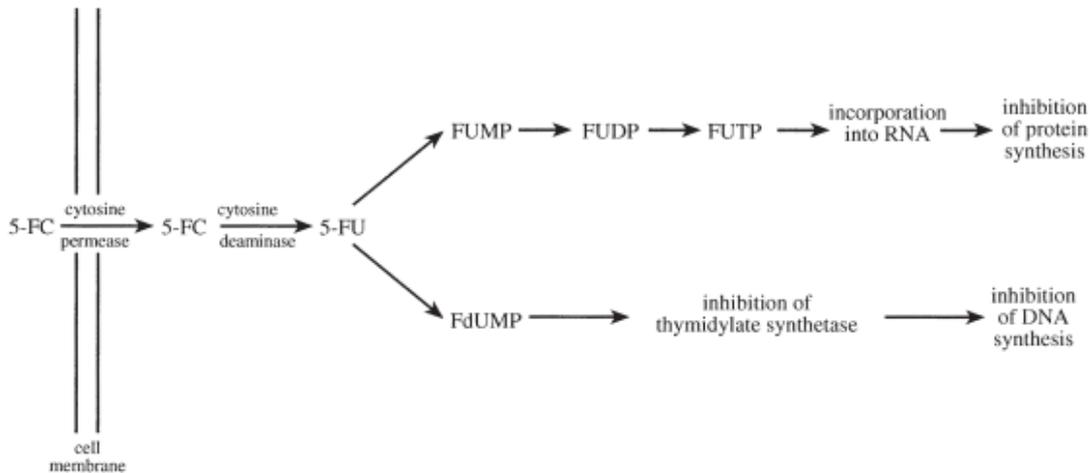


Figure 9 : Entrée et action du 5-FU dans les cellules infectées par un agent fongique. (A. Vermes and al. 2000) 5-FC : flucytosine; 5-FU : 5-fluorouracil; FUMP : 5-fluorouridine monophosphate; FUDP : 5-fluorouridine diphosphate; FUTP : 5-fluorouridine triphosphate; FdUMP : 5-fluorodeoxyuridine monophosphate

Escherichia coli possède cette enzyme. Une combinaison du 5-FC avec le gène d'*Escherichia coli* codant pour la cytosine désaminase pourrait donc permettre une concentration locale du 5-FU au site de la tumeur plus importante. En effet, la cytosine désaminase ne se situant que dans la zone cancéreuse, le 5-FU se concentre uniquement à cet endroit. (A. Vermes and al. 2000).

- Pharmacocinétique de la 5-FC

La 5-FC a une très bonne absorption par voie orale (76 à 89 %). De plus, cette molécule est hydrosoluble et de petite taille, ce qui permet une bonne distribution dans l'organisme. L'élimination du 5-FC est rénale et sa clairance est supérieure à 40mL/min chez des patients sains. Les doses doivent donc être modifiées en cas d'insuffisance rénale. En effet, la demi-vie du 5-FC chez des patients sains est de 3 à 4h alors qu'elle peut atteindre 85 h chez des patients insuffisants rénaux. L'amphotéricine B permet ainsi une augmentation de la demi-vie de la 5-FC par altération de la filtration glomérulaire. (A. Vermes and al. 2000)

- Toxicité du 5-FC

En médecine humaine, lors de traitement à 200 mg/kg/j, posologie « classique », la 5-FC peut avoir des effets secondaires mineurs tels que diarrhée, vomissement, nausée ou douleur abdominale (chez 6% des patients traités). (A. Vermes and al. 2000). Mais aussi une toxicité hépatique et hématologique. (A. Vermes and al. 2000). L'hépatotoxicité est visible

par une augmentation de la concentration sanguine en transaminases et alcalines phosphatases. Les effets secondaires hématologiques sont dus à une dépression de la moelle osseuse et peuvent entraîner une leucopénie, une thrombocytopénie ou une pancytopénie. Le mécanisme et la fréquence de ces effets secondaires sont inconnus. Ils semblent cependant être dose-dépendante et pouvoir être évités grâce à une surveillance précise de la concentration sanguine (devant rester inférieure à 100 mg/L). Ils sont généralement réversibles lors de l'arrêt du traitement ou de la réduction des doses. Aucun effet secondaire cutané n'est rapporté chez des patients humains (à l'exception de réaction allergique rare). (A. Vermes and al. 2000).

En médecine vétérinaire, il a été constaté dans plusieurs cas cliniques que la flucytosine peut causer chez le chien une toxicité cutanée. Celle-ci se manifeste généralement après 20 jours de traitement par des éruptions cutanées avec dépigmentation pouvant s'aggraver d'ulcérations, d'exsudations ou de formations de croûtes. Ces lésions sont souvent localisées au niveau du chanfrein, du scrotum et des babines et plus rarement de la vulve. Elles rétrocedent généralement lors de l'arrêt du traitement et se résolvent totalement 2 semaines à 2 mois après l'arrêt du traitement. Il est également noté que les lésions sont plus importantes lorsque la flucytosine a été poursuivie pendant plusieurs jours après l'apparition des lésions. (R. Malik and al. 1996, E. R Block and J. E. Bennett, 1972)

2. 5-FU

En médecine vétérinaire, l'administration de 5-FU est indiquée dans la prise en charge des carcinomes mammaires canins, des carcinomes épidermoïdes et de certains types tumoraux digestifs. (K. Menard and al. 2018) (T. Aparicio and al. 2002).

- Mode d'action du 5-FU

Le 5-fluorouracile (5-FU) ressemble à l'uracil ; la seule différence avec le précurseur d'acide nucléique est la présence d'un atome de fluor sur le carbone 5 (figure 17). Cette différence fait du 5-FU un anti-métabolite du type anti-pyrimidique qui inhibe la synthèse d'ADN. Cette fonction permet son utilisation dans le traitement des cancers car les cellules tumorales utilisent plus d'uracile que les cellules saines.

Il existe 2 voies de transformation du 5-FU (T. Aparicio and al. 2002) :

- L'anabolisme qui entraîne l'arrêt de la synthèse de thymidine à partir de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) grâce à la transformation du 5-FU en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) inhibiteur de la thymidilate synthétase (TS) qui synthétise la thymidine. Cette voie permet au 5-FU d'avoir une action inhibitrice sur la phase S du cycle cellulaire. Des voies mineures peuvent aussi expliquer une toxicité du 5-FU : le 5-FU peut aussi devenir du 5 fluorouridine triphosphate (5-FUTP) pouvant s'incorporer aux ARNm, ARNr et

ARNt et bloquer leur maturation. Le 5-FdUTP peut aussi s'incorporer aux ARN et les fragmenter (figure 8).

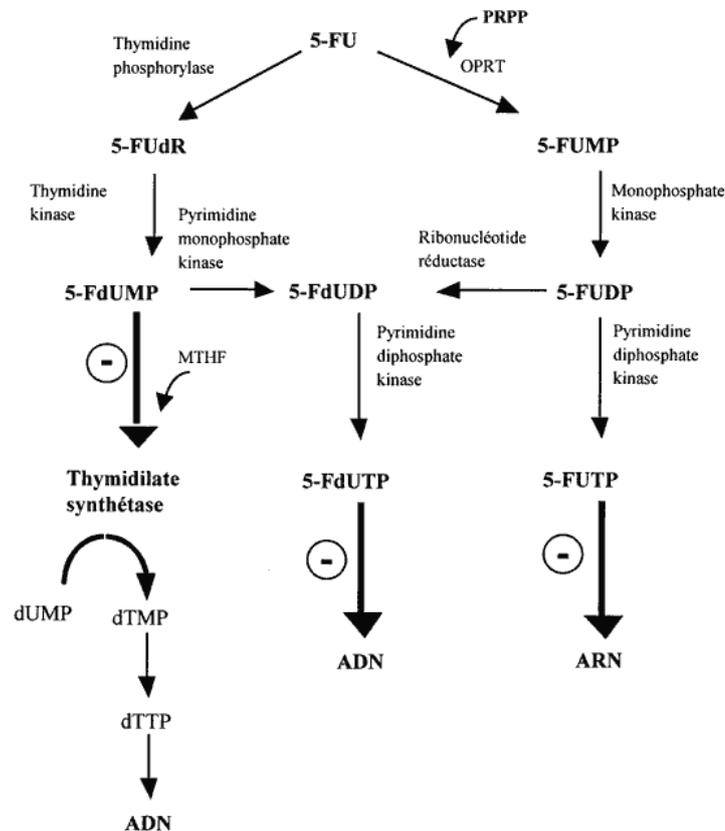


Figure 10 : Anabolisme du 5-FU (T. Aparicio and al. 2002)

5-FudR : 5-fluorodésoxyuridine5 ; FdUMP : 5-fluorodésoxyuridine monophosphate ; 5-FdUDP : 5-fluorodésoxyuridine diphosphonate ; 5-FdUTP : 5-fluorodésoxyuridine triphosphonate ; 5-FUMP : 5-fluorouridine monophosphate ; 5-FUDP : 5-fluorouridine diphosphate ; 5-FUTP : 5-fluorouridine triphosphate ; dUMP : désoxyuridine monophosphate ; dTMP : désoxythymidine monophosphate ; OPRT : orotate phosphoribosyl transferase ; PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate ; MTHF : 5,10-méthyltétrahydrofolate

- Le catabolisme peut expliquer la toxicité cardiaque et neurologique du 5-FU (figure 9). Il entraîne la production d'urée ou de fluoroacétate, des poisons du cycle de krebs. La dihydropyrimidine déhydrogénase (DPD) suit un rythme nyctéméral et est présente dans la majorité des tissus notamment dans les lymphocytes et le foie. Cette enzyme réduit le 5-FU en 5-fluorodihydrouracile (5-FUH2). Le 5-FUH2 est ensuite catabolisé en acide 5-fluorouréidopropionique (5-FUPA) par la dihydropyrimidase puis en α -fluoro β -alanine (FBAL) par la β -uréidopropionase. Le FBAL est enfin transformée en urée ou en fluoroacétate. La conjugaison du FBAL en FBAL-chénodésoxycholate, un cholestatique peut aussi expliquer l'hépto toxicité du 5-FU.

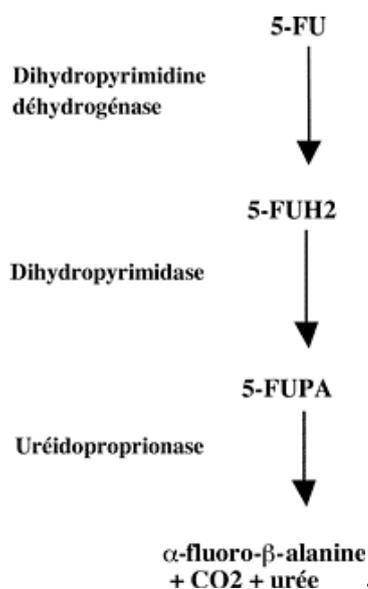


Figure 11 : Catabolisme du 5-FU (T. Aparicio and al. 2002)

5-FUH2 : 5-fluorodihydrouracile ; 5-FUPA : acide 5-fluorouréidopropionique

- La pharmacocinétique du 5-FU

Malgré de nombreuses études, la biodisponibilité orale du 5-FU est médiocre et très variable (0 à 80%), notamment à cause de l'effet de premier passage hépatique et des différences interindividuelles d'activité de la DPD dans les muqueuses digestives et le foie. (N. Christophidis and al. 1978)

C'est pourquoi, la création de pro-drogue ou d'analogues du 5-FU avec une bonne biodisponibilité orale est en cours de recherche.

Disponible depuis peu en France, la doxifuridine ou un de ses précurseurs la capécitabine, aurait une meilleure résorption orale.

Des études de phase II ont également été menées avec une pro-drogue du 5-FU : le tégafur. Celui-ci est métabolisé en 5-FU dans le foie par la thymidine phosphorylase. Les études réalisées sur des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques montrent des taux de réponse tumorale allant de 11 % en monothérapie à 40 % en association à l'acide folinique.

Par voie intraveineuse, la demi-vie du 5-FU est très courte (8 à 22 min). Le volume de distribution est important (14 à 54 L) et la clairance est élevée (0,8 à 1,9 L/min). La clairance du 5-FU décroît avec l'augmentation des doses en raison du caractère saturable du catabolisme du 5-FU. Cette clairance est supérieure en perfusion continue par rapport au bolus et peut atteindre jusqu'à 7 L/min alors que la vascularisation hépatique n'est que de 1.5 L/min ce qui amène à penser que d'autres tissus possédant de la DPD pourraient

également dégrader la 5-FU. De plus, le rythme circadien de la DPD entraîne également une variation circadienne de la concentration plasmatique en 5-FU. (T. Aparicio and al. 2002)

- La toxicité du 5-FU

Les épithéliums digestifs, les tissus hématopoïétiques et autres tissus à renouvellement rapide sont les plus atteints par la toxicité, dose dépendante, du 5-FU. Le 5-FU peut donc avoir comme effet secondaire une diarrhée, une stomatite et une myélosuppression modérée dont le nadir se situe aux alentours de 10 jours après l'injection. Une cardiotoxicité, une hépatotoxicité et une neurotoxicité sont aussi possibles comme expliqués précédemment, bien que rares. (T. Aparicio and al. 2002).

Le mode d'administration influence fortement la toxicité, ainsi la toxicité hématologique et notamment la neutropénie est plus souvent limitante lors d'administration en bolus. Le syndrome érythrodysesthésique palmoplantaire (mains-pieds) est plus fréquent en cas de perfusion continue. (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998)

Certains patients (1 à 3% de la population générale) (MC Etienne and al. 1994) peuvent ressentir une forte toxicité hématologique, au niveau des muqueuses et neurologique. Cette toxicité est due à un déficit congénital en DPD. L'apparition de ces effets n'est aujourd'hui prédictible par aucun test génétique, seul un dépistage du déficit en DPD grâce à la mesure de l'enzyme à partir des cellules mononuclées circulantes est possible mais non réalisé en routine.

Le ratio prétraitement diouracile/uracile plasmatique pourrait, d'après une étude sur 81 malades traités au 5-FU, être un bon indicateur corrélé à la clairance et au taux plasmatique de 5-FU. Ainsi aucun effet secondaire n'a été observé pour un ratio inférieur à 1.8. (E. Gamelin and al. 1999)

Des effets secondaires moins graves mais pouvant avoir une action dose limitante et diminuer le confort de vie ont également été observés. L'injection intraveineuse de 5-FU a notamment entraîné l'apparition d'une stomatite, causant de nombreux ulcères buccaux. (T. Aparicio and al. 2002)

Cet effet secondaire peut être diminué de manière significative par une cryothérapie orale per-injection. Nausée, diarrhée et érythrodysesthésie palmo-plantaire sont également courant lors d'injection continue de 5-FU.

En conclusion, les différentes études montrent que le 5-FU est bien toléré avec des taux de toxicités sévères inférieurs à 5 % si on exclut les rares cas de déficit en DPD. (T. Aparicio and al. 2002). Les effets secondaires légers, tel que des pathologies cutanées restent par ailleurs fréquents.

- Résistance au 5-FU

Certaines cellules cancéreuses montrent cependant des résistances au 5-FU par différents mécanismes :

Tout d'abord, lors de certains cancers, on observe une amplification génétique de la TS et donc une augmentation de sa quantité disponible pour la fabrication de l'ADN et l'anabolisme du 5-FU. La quantité de pyrimidines peut également être augmentée par des voies de secours indépendantes de la TS. Lors de cancers, les anomalies de l'ADN ne suffisent parfois pas à arrêter le cycle cellulaire. Enfin, la DPD peut être surexprimée au niveau des cellules tumorales ce qui entraîne un catabolisme plus rapide du 5-FU.

- Utilisation du 5-FU

Les traitements de beaucoup de cancers comprennent du 5-FU seul ou en association avec d'autres molécules cytostatiques. Par exemple, dans le cancer du côlon, une chimiothérapie adjuvante par du 5-FU modulé par le lévamisole (G. Charles and al. 1990) ou l'acide folinique a permis d'obtenir des gains de survie. En cas de métastases, des polychimiothérapies comportant du 5-FU ont également montré des gains de survie dans les cancers du côlon (W. Scheithauer and al. 1993), du pancréas (KR. Palmer and al. 1994) et de l'estomac (AM. Murad and al. 1993).

L'acide folinique permet d'augmenter l'action du 5-FU par prolongation de l'inhibition de la TS. En effet, l'acide folinique se réduit en MTHF, stabilisateur du complexe FdUMP-TS qui inhibe la TS. Lors de traitement au 5-FU, l'acide folinique est donc souvent utilisé comme modulateur. (T. Aparicio and al. 2002).

Malgré le fait que l'administration continue serait plus adaptée (demi vie courte et action uniquement durant la phase S), la perfusion courte est le mode d'administration le plus répandu notamment grâce à sa praticité.

Différentes études corroborent cette idée en montrant une amélioration du taux de réponse et plus modestement du taux de survie lors d'administration continue par rapport à la perfusion courte. (Meta-Analysis Group In Cancer, 1998)

Les progrès de la science et notamment du matériel de perfusion portable et de la stabilité de la molécule rendent l'injection en continu possible. Le traitement standard de référence en France est donc devenu le protocole LV5FU2 alliant une perfusion continue de 5-FU et une modulation par l'acide folinique ce qui permet d'avoir une action continue au niveau de l'ADN et de l'ARN. Ce protocole est plus efficace et mieux toléré que les bolus de 5-FU et d'acide folinique dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. (A de Grammont and al. 1997)

Une étude de phase II, avec adaptation des doses de 5-FU aux taux plasmatiques, a rapporté 56 % de réponse objective et une médiane de survie de 19 mois. Une étude de phase III

comparant le même protocole de 5-FU hebdomadaire avec ou sans adaptation de doses aux taux plasmatiques rapporte une différence significative de taux de réponse (33 vs 17 %) et une amélioration non significative de la survie (16 vs 13 mois). Ces travaux soulignent l'importance de l'adaptation individuelle du traitement par 5-FU pour obtenir la concentration plasmatique maximale tolérable. (T. Aparicio and al. 2002).

- Association du 5-FU avec la radiothérapie

Le 5-FU entraîne l'inhibition de la TS ce qui empêche la réparation des lésions radio induites à cause de la déplétion en thymine.

Plusieurs études cliniques, notamment sur le cancer du rectum, ont montré une augmentation de la survie et une diminution des récives locales lors de l'association en post opératoire d'une chimiothérapie systémique, puis d'une radiochimiothérapie par 5-FU par rapport à une radiothérapie seule. (T. Aparicio and al. 2002).

d) Données pré-cliniques

En 2015, L. Fend et ses collègues, réalisent une étude sur modèle murin immunocompétent. L'action du TG6002 sur des carcinomes rénaux métastasants spontanément au poumon est observée. Ce cancer est très répandu en pays développé ; il possède cependant un pronostic défavorable et des moyens de traitement limité (rechute chez 40% des patients ayant subi une néphrectomie, résistance à la chimiothérapie et radiothérapie). L'administration multiple systémique de TG6002 par voie intrapéritonéale permet de limiter la croissance tumorale. Une infiltration tumorale de lymphocytes T CD8+ accrue et une déplétion en CD4+ sont également constatées. L'injection de TG 6002, 8 jours après la greffe des cellules cancéreuses, augmente significativement la survie des animaux porteurs de tumeurs. La bithérapie par ajout de 5-FC n'augmente pas davantage la survie des animaux mais limite la croissance tumorale *in situ*. Une inhibition de la croissance tumorale après l'injection de TG6002 est observée. Cette étude a également permis de vérifier le ciblage du tissu tumoral dans le rein après une injection systémique. En effet, l'expression des protéines virales était limitée aux zones tumorales des reins échantillonnés. (L. Fend and al. 2015)

En 2017, B. Heinrich et son équipe réalisent une étude *in vitro*, sur l'immunogénicité des virus de la vaccine oncolytique JX-GFP et TG6002 sur des cellules de mélanome humain. Cette étude montre un effet synergique du TG6002 et du 5-FC. (B. Heinrich and al. 2017)

En 2019, J. Foloppe et son équipe réalisent des injections systémiques de TG6002 (à la dose de 10^6 PFU) et une administration per-os de 5-FC (200mg/kg/j) chez des souris porteuses de xénogreffes de tumeurs humaines. Cette étude met en évidence une réplication virale et une concentration importante en 5-FU localisées uniquement dans les cellules tumorales. Une

diminution de la taille des tumeurs traitées est également mise en évidence. (J. Foloppe and al. 2019).

D. Autres vecteurs oncolytiques dérivés du virus de la vaccine

Il y a actuellement 3 vecteurs viraux oncolytiques de la vaccine : GLV-1h68 (Genelux Coporation, USA), L1VP (Genelux Corporation, USA) et JX 594 (Jennrex Biotherapeutics, San Francisco, USA) qui sont actuellement en cours d'essais cliniques. (G. Dranoff, 20002).

Le GLV-1h68 est basé sur la souche Lister du virus de la vaccine. Trois gènes marqueurs y ont été insérés codant pour la fusion de la protéine fluorescente Renilla luciférase-verte (RUC-GFP), de la β -galactosidase et de la β -glucuronidase respectivement dans les locus codant pour les protéines F14.5L, J2R (codant pour la thymidine kinase (TK)) et A56R (codant pour l'hémagglutinine) du génome viral. Ces 3 gènes servent de marqueurs à l'expression virale sans intervenir dans le cycle oncolytique. En 2009, I. Gentshev et son équipe montrent que le GLV-1h68 permet l'élimination de cellules d'adénome canin à la fois en culture cellulaire et chez des souris immunodéprimées.

Le JX-594 est un poxvirus issu de la souche Wyeth génétiquement modifiée présentant une mutation dans le gène de la TK permettant un ciblage des cellules cancéreuses. Une insertion du gène *GM-CSF* humain augmentant la réponse immunitaire antitumorale et une insertion du gène *LacZ* en tant que marqueur viral. (H. Fukuhara and al. 2016)

Un essai de phase III chez des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire au stade avancé est en cours. Dans cette étude, le JX 594 (10^9 pfu) est administré par voie intratumorale trois fois toutes les deux semaines, associé à une thérapie ciblée (à base de sorafénib), dans le groupe témoin, les patients reçoivent uniquement du sorafénib. Les résultats de cette étude sont attendus pour décembre 2020. (H. Fukuhara and al. 2016)

Le L1VP 6.1.1 a été isolé à partir de virus sauvages de la souche Lister du virus de la vaccine et représente un virus natif (aucune manipulation génétique n'a été effectuée). Il a cependant été observé que le gène de la thymidine kinase de L1VP 6.1.1 est naturellement inactif. (Gentshev and al. 2013)

III) Les différents vecteurs viraux oncolytiques

Plusieurs virus peuvent être utilisés dans la lutte contre le cancer. Il faut donc déterminer quel virus oncolytique est le plus adapté dans le traitement de chaque cancer. Pour cela, il faut analyser les spécificités de chaque virus (Tableau 1).

Virus	Génome	Enveloppé	Famille	Réplication
Adénovirus	ADN, double brin, linéaire	non	<i>Adenoviridae</i>	nucléaire
HSV1	ADN, double brin, linéaire	oui	<i>Herpesviridae</i>	nucléaire
NDV	ARN, 1 brin négatif, non segmenté	oui	<i>Paramyxoviridae</i>	cytoplasmique
Parvovirus autonomes	ADN, 1 brin	non	<i>Parvoviridae</i>	nucléaire
Poliovirus	ARN, 1 brin positif	non	<i>Picornaviridae</i>	cytoplasmique
Réovirus	ARN, double brin, segmenté	non	<i>Reoviridae</i>	cytoplasmique
VSV	ARN, 1 brin négatif, non segmenté	oui	<i>Rhabdoviridae</i>	cytoplasmique
Vaccine	ADN, double brin	oui	<i>Poxviridae</i>	cytoplasmique

Tableau 1: Caractéristique biologique des virus majoritairement utilisés dans le cadre des études sur les virus oncolytiques. (M. Szelechowski and al. 2005)

La réalisation d'études permettant de comparer les virus oncolytiques, leur efficacité et leur coût est importante. Ces virus oncolytiques idéaux seront sûrement différents selon le type de tumeur envisagé et de la voie d'administration.

Deux modes d'administration sont actuellement étudiés. D'une part, une injection intratumorale permettant d'échapper, tout au moins en partie, au système immunitaire et de réduire les doses de virus à injecter mais nécessitant un accès à la tumeur. D'autre part, une injection du virus par voie intraveineuse permettant un traitement des métastases diffuses et des tumeurs non accessibles chirurgicalement mais nécessitant un titre en virus plus élevé et un échappement au système immunitaire (M. Szelechowski A. Saïb, 2005).

A. Les virus naturellement oncolytiques

a) *Les Réovirus*

1. *Structure et génome*

Les Réoviridae sont des virus à ARN, double brin, linéaire, divisé en 10 segments codant pour 11 protéines. Ils sont non enveloppés avec une double capsidie protéique à symétrie icosaédrique, d'un diamètre de 80 nm. Leur génome comporte entre 15 et 27 kilo bases.

Chez l'adulte, il est peu probable que le réovirus de mammifère soit naturellement pathogène.

Le cycle répliatif (figure 10) des réovirus commence par la pénétration transmembranaire du virus dans les cellules après digestion protéolytique de la capsidie ou via une endocytose. Cette endocytose est suivie d'une digestion partielle de la capsidie externe par des enzymes lysosomiales (permettant la traversée de la membrane de l'endosome par le virus).

La transcription se fait ensuite par des enzymes présentes dans la capsidie interne du virus, puis l'ARN messager coiffé est libéré dans le cytoplasme. La traduction de ces ARNm permet la synthèse des différentes protéines virales qui s'assemblent pour former de nouvelles particules virales. Au sein de ces particules, le génome viral est répliqué par copie de la matrice d'ARN messager monocaténaire en ARN bicaténaire. La capsidie externe est finalement rajoutée de manière à former un virion prêt à être libéré.

Le cycle répliatif des réovirus s'achève généralement par la lyse cellulaire entraînant le relargage de particules virales. (Lemay G 2002).

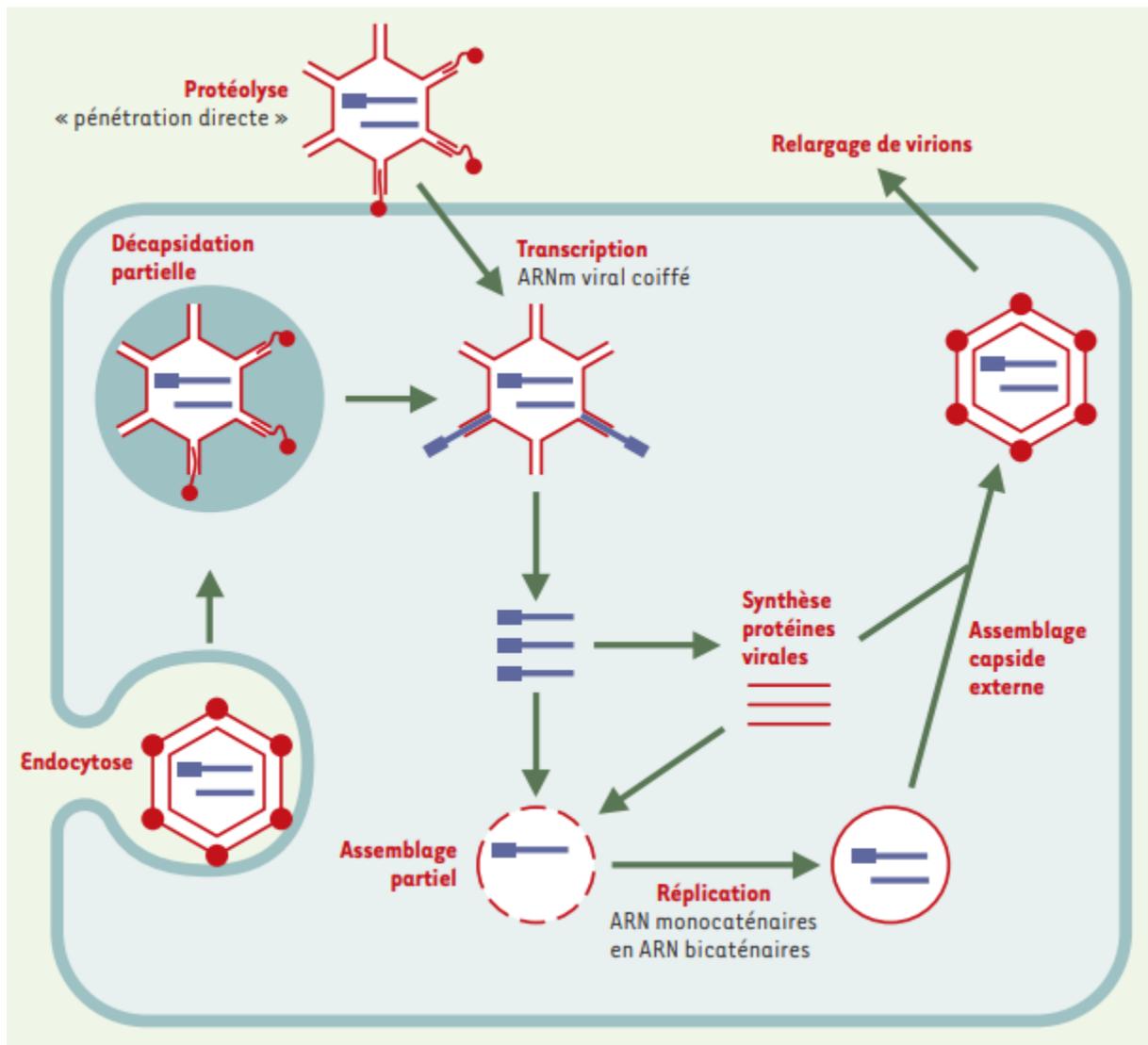


Figure 12 : Le cycle répliatif des réovirus (Lemay G. 2002)

Les réovirus ont un tropisme naturel pour les cellules transformées qui possèdent un environnement favorable à leurs répliations. En effet, les cellules transformées surexpriment les récepteurs EGF (epidermal growth factor) sur lesquels se lient les réovirus pour entrer dans les cellules et se répliquer.

Les cellules transformées par l'oncogène Ras sont naturellement plus sensibles aux Réovirus qui ne possèdent pas de gènes inhibant la protéine PKR ou les IFN. Les réovirus ont donc un tropisme naturel pour les cellules tumorales. (Lemay G, 2002)

2. Données actuelles

En 2017, CC Hwang et son équipe réalisent une étude de tolérance avec un réovirus non modifié de sérotype 3 (REOLYSIN®) sur des chiens ayant des tumeurs spontanées. Un total de dix neuf chiens avec des tumeurs (mélanome buccal, liposarcome, mastocytome cutanée, lymphome) de stades divers ont été traités. Des doses de 10^8 à 5×10^9 TCID₅₀ ont été injectées en intratumorale ou en intraveineux quotidiennement pendant 5 jours ou sur plusieurs cycles.

Les effets secondaires (fièvre, vomissements, diarrhée et inflammation de la tumeur lors d'injection par voie intratumorale), classés selon le Veterinary Cooperative Oncology Group, sont limités au grade I ou II. La plupart des chiens n'ont cependant pas présentés d'effet secondaire.

L'excrétion virale, les anticorps anti-réovirus neutralisant (NARA) et la détection immunohistochimique de protéines du réovirus dans les tumeurs (IHC) ont également été évalués. Aucun virus infectieux n'a été retrouvé et tous les chiens avaient des niveaux élevés d'anticorps anti-réovirus neutralisant après le traitement. Bien que les résultats d'immunohistochimie étaient seulement disponibles chez six chiens, quatre ont été détectés positifs.

Cette étude montre donc que les réovirus sont sûrs et bien tolérés par voie intratumorale et intraveineuse jusqu'à des dose de 5.0×10^9 TCID₅₀.

Bien que le but premier de cette étude ne soit pas d'évaluer l'efficacité des réovirus en tant que virus oncolytiques, une réduction de la taille de la tumeur cible a été notée pour cinq chiens. Six chiens ont également connu une forme notable de réduction des signes cliniques cliniques liée à la maladie tels qu'une amélioration de la miction, une réduction de la douleur tumorale, une amélioration de la mobilité ou une récupération de l'appétit. Des biopsies tumorales ont été obtenues à partir de six chiens permettant la réalisation de colorations immunohistochimiques (IHC). Quatre des six échantillons ont présenté une analyse immunohistochimique positive pour le réovirus.

En conclusion, cette étude montre l'innocuité de ce réovirus de sérotype 3 jusqu'à 5.0×10^9 TCID₅₀ lors d'injection intraveineuse ou intratumorale. Ces données laissent aussi penser que les réovirus peuvent potentiellement être efficaces dans la lutte contre diverses tumeurs canines.

b) Les Parvoviridae

1. Structure et génome

Les parvovirus sont capables d'infecter un grand nombre de vertébrés et d'arthropodes. Comme expliqué précédemment, leur déficit en ADN polymérase et leur incapacité à entraîner la mitose cellulaire leur confèrent un tropisme naturel pour les tissus en division.

Ce sont des petits virus non enveloppés, possédant une capsidie icosaédrique de 20 à 25nm. Leur matériel génétique est stocké sous forme d'ADN linéaire monocaténaire d'environ 5kb.

Le génome de ces virus est constitué de deux sous unités (figure 11). Le promoteur P4, proche de l'extrémité 3', contrôle la synthèse d'un ARN dont l'épissage alternatif permet la synthèse de deux protéines non structurales NS1 et NS2. Ces protéines sont différentes au niveau de leur extrémité C-terminale. NS1 joue un rôle primordial dans la réplication de l'ADN viral, la toxicité du virus et la transcription du second promoteur P38. Ce promoteur permet l'expression d'un ARN codant pour les protéines de la capsidie VP1 et VP2.

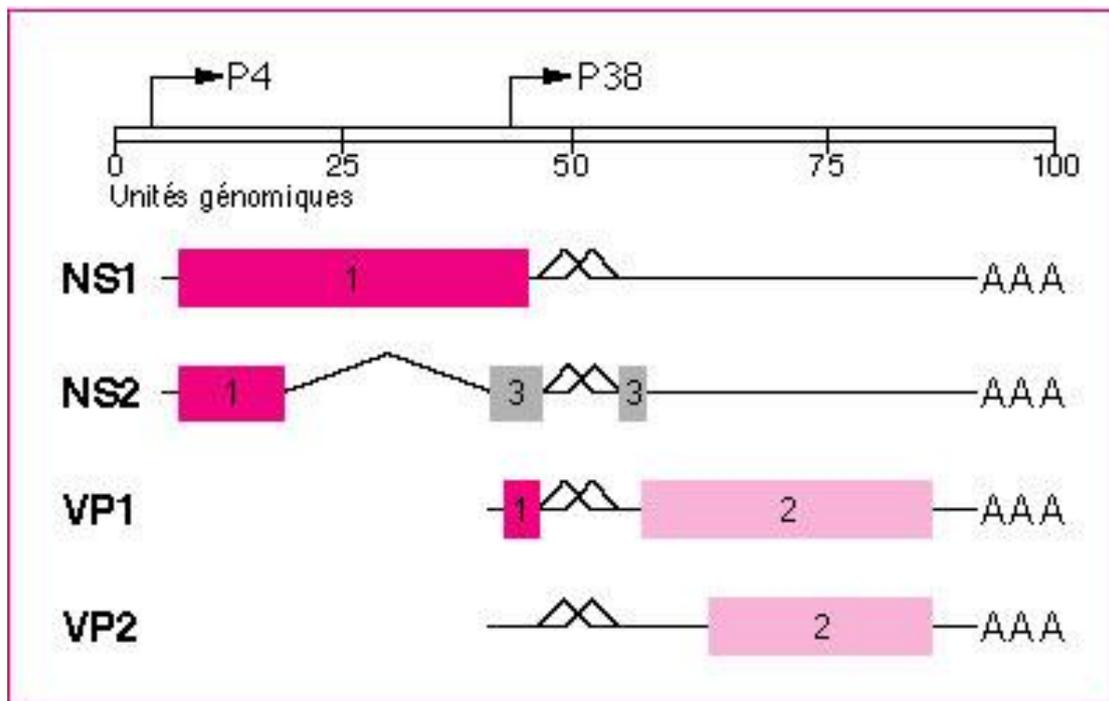


Figure 13 : Exemple d'organisation génomique d'un parvovirus (Deleu et al. 2002)

Le cycle répliatif des parvovirus (figure 12) commence par la fixation du virus sur la membrane cellulaire et la pénétration au sein de celle-ci par une endocytose. Suite à l'entrée dans la cellule, le génome se décapsidie partiellement et passe dans le noyau cellulaire. Ces deux premières étapes peuvent se réaliser à tout moment du cycle cellulaire. Lorsque la cellule infectée passe en phase S, l'expression des gènes viraux a lieu grâce à la réplication de l'ADN monocaténaire en ADN bicaténaire, à la cycline A et aux facteurs de transcription

E2F/ DP. P4 est alors activé, entraînant ainsi la synthèse de NS1, de la descendance virale puis de VP1 et VP2. Les virions complets sont assemblés dans le noyau puis transportés dans le cytoplasme. La lyse de la membrane de la cellule infectée, souvent par apoptose, permet la libération des virions.

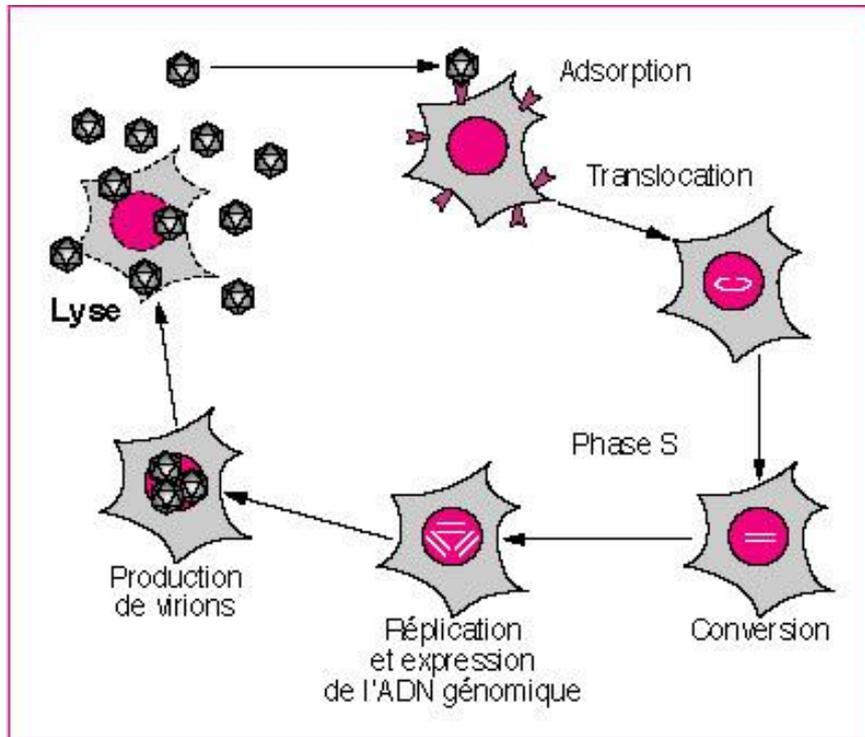


Figure 14 : Cycle réplcatif des parvovirus (Deleu et al. 2002)

En condition expérimentale, les parvovirus exercent une action oncolytique ; les mécanismes moléculaires de cette suppression tumorale restent cependant à identifier.

L'utilisation thérapeutique des parvovirus nécessite impérativement un ciblage des cellules cancéreuses.

Deux niveaux de spécificité ont été mis en évidence :

D'une part, la transformation cellulaire par des oncogènes exacerbe les propriétés cytotoxiques de la protéine virale NS1, inoffensive pour les cellules normales et toxiques pour celles transformées.

D'autre part, la transformation oncogénique, entraînant une forte réplication et donc une expression importante du génome viral active le cycle parvoviral.

Les cellules néoplasiques sont donc plus permissives à l'infection que les cellules normales. (Deleu et Al. 2002).

2. Données actuelles

En 2017, K. Geletneky et ses collègues réalisent un essai clinique de phase I et IIa. Le parvovirus H1-PV nommé ParvOryx est injecté par voie intratumorale et intraveineuse à des patients atteints de glioblastomes. Les doses maximales injectées sont de 10^9 PFU par voie intratumorale et 10^8 PFU par voie intraveineuse. La tumeur est résectionnée 9 jours plus tard et le virus est déposé dans la cavité de résection. Cette étude permet de confirmer la tolérance et l'innocuité de H1-PV. En effet, le virus a été bien toléré sur l'ensemble des doses étudiées. Aucun signe d'inflammation systémique, d'activation immunitaire excessive ou de toxicité sur les organes vitaux n'a été observé. De plus, aucune mutation n'a été retrouvée dans les virus présents dans les tumeurs résectionnées.

Cette étude a également montré la capacité de ParvOryx à franchir la barrière hémato-encéphalique/ tumorale. La survie des patients traités par ParvOryx semble également être supérieure aux données empiriques.

Enfin, aucune particule virale infectieuse n'a été détectée dans les fèces ou les urines à un niveau supérieur aux limites inférieures de quantification. Ceci exclut le risque de transmission du virus chez les patients de l'étude dans la plage de doses administrées.

Le parvovirus H1-PV semble donc être un candidat intéressant pour la virothérapie oncolytique.

c) Les Rhabdoviridae

1. Structure et génome

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est le principal virus oncolytique de la famille des Rhabdovirus.

Les rhabdovirus possèdent une enveloppe, une symétrie hélicoïdale et un ARN simple brin négatif non segmenté de 12kb. Ces virus ont une morphologie particulière dite en « Balle d'obus » de 120 à 180nm, c'est-à-dire une extrémité plate et une arrondie (Figure13). Une nucléocapside hélicoïdale composée d'une nucléoprotéine N entoure l'ARN et protège le génome. Cette capsid est elle-même protégée par une matrice constituée de protéine M recouverte en surface de glycoprotéine G.

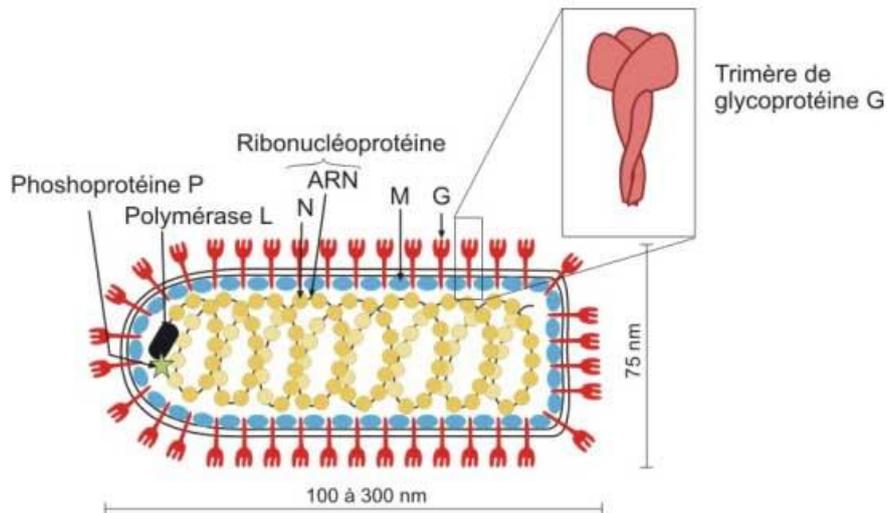


Figure 15 : Structure des rhabdovirus (A. Decoster, JC. Lemahieu , H. Peigue-Lafeuille, 2005)

Le cycle réplcatif des rhabdovirus (figure 14) commence par la fixation des glycoprotéines G aux récepteurs cellulaires puis l'endocytose du virion. L'ARN est transcrit puis traduit dans le cytoplasme permettant ainsi la création des protéines nécessaires à la réplication virale et à la synthèse des protéines structurales. L'assemblage des nouveaux virions se réalise dans le cytoplasme. Les descendants viraux sont libérés par bourgeonnement externe à partir de la membrane cytoplasmique, de la membrane du réticulum ou de l'appareil de Golgi (dans ce cas, les virions sont transportés dans des vésicules qui fusionnent avec la membrane cytoplasmique).

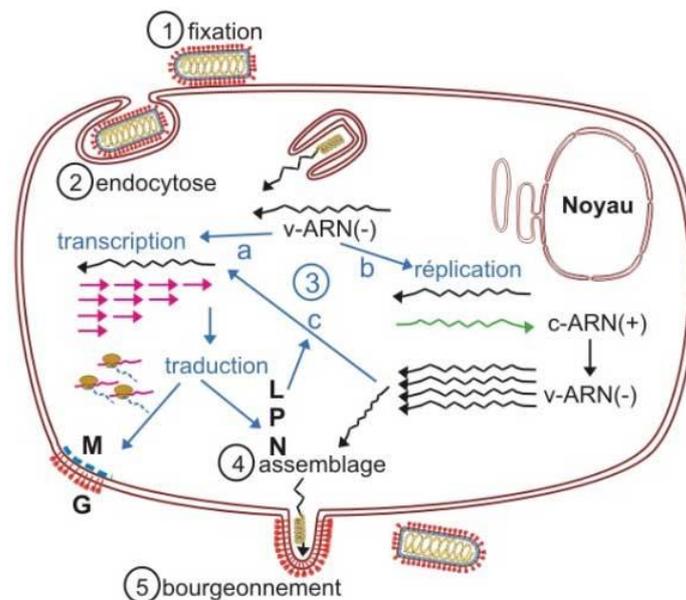


Figure 16 : Cycle réplcatif des rhabdovirus (A. Decoster and al. 2005)

Tout comme les réovirus, le VSV a un défaut dans la voie IFN/PKR ce qui le rend très sensible à l'inhibition de la synthèse d'ARNm par l'interféron. Le VSV a donc un tropisme naturel pour les cellules déficientes en interféron, c'est à dire les cellules tumorales. (Szelechowski et Saib 2005)

2. Données actuelles

En 2010, N. Jenks et son équipe réalisent une étude pré-clinique du virus de la stomatite vésiculeuse génétiquement modifié exprimant l'interféron- β humain (VSV-hIFN β) chez des rats, des souris et des macaques. L'objectif de cette étude est d'établir la dose initiale pour l'injection intratumorale du virus oncolytique chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire (HCC). Aucun effet secondaire n'a été observé après l'administration de $7,59 \times 10^9$ DICT₅₀ (dose infectante pour culture tissulaire à 50%) de VSV-hIFN β dans le lobe hépatique latéral gauche des rats. Les taux plasmatiques d'alanine aminotransférase et de phosphatase alcaline ont augmenté et le nombre de plaquettes a diminué chez les animaux traités les jours 1 et 2, mais est revenu au niveau de prétraitement au jour 4. Aucun virus infectieux n'a été retrouvé dans le foie, le cerveau ou la rate des animaux. (N Jenks and al. 2010)

Le VSV-hIFN β a également été injecté dans des foies normaux ou dans une xénogreffe d'HCC intrahépatique chez les rats Buffalo. Ceux-ci étaient plus sensibles aux effets neurotoxiques du VSV; la concentration sans effet indésirable observable (DSENO) du VSV-hIFN β chez le rat Buffalo était de 10^7 DICT50. Des doses plus élevées ont été associées à une neurotoxicité fatale et le virus infectieux a été récupéré de la tumeur et du cerveau. Par rapport au VSV-hIFN β , la toxicité du VSV-rIFN β (IFN- β de rat exprimant le VSV recombinant) a été considérablement réduite chez les rats Buffalo.

Deux groupes de deux macaques rhésus mâles adultes ont reçu 10^9 ou 10^{10} DICT₅₀ de VSV-hIFN β injectés directement dans le lobe hépatique gauche sous contrôle tomographique. Aucun signe neurologique n'a été observé. Aucune anomalie (hématologie, biochimie, poids corporel, examen clinique, comportement) n'a été constatée et tous les macaques ont développé des anticorps neutralisants anti-VSV. De même, aucun effet indésirable n'a été observé lors d'injection de VSV par voie intranasale ou intramusculaire à plus de 150 macaques rhésus. (N. Jenks and al. 2010)

Les essais cliniques du VSV en injection intrahépatique ont pris du retard en raison des préoccupations liées à sa neurovirulence potentielle. Cette étude de toxicologie et de pharmacologie préclinique appuie un essai clinique prudent à doses croissantes visant à déterminer l'innocuité de VSV-hIFN β chez les patients atteints de CHC.

Le VSV recombinant est donc un virus prometteur avec une activité anti-tumorale puissante qui doit être évaluée cliniquement. (N. Jenks and al. 2010).

d) Les Paramyxoviridae

1. *Structure et génome*

Le principal représentant de cette famille en ce qui concerne la virothérapie oncolytique est le virus de la maladie de Newcastle (NDV).

Les paramyxovirus sont des virus à ARN négatif, non segmenté formant une nucléocapside hélicoïdale. Ce sont des virus enveloppés de forme sphérique et d'environ 200nm. L'enveloppe dérive pour sa partie lipidique de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et porte des glycoprotéines assurant l'activité hémagglutinine (H), neuraminidase (N) et de fusion (F) (figure 15).

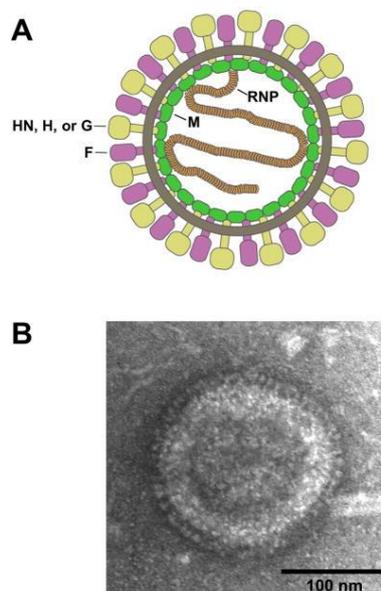


Figure 17 : Structure des paramyxovirus (M S. Harrison and al. 2010)

Le virus se fixe aux récepteurs cellulaires grâce à la protéine H ; la protéine F permet alors la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, la réplication du génome et sa transcription en ARN messager par l'ARN polymérase débute. Les paramyxovirus ont la particularité d'avoir un gradient de transcription dans lequel les gènes situés à proximité de l'extrémité 3' du génome sont transcrits plus abondamment que ceux situés à proximité de l'extrémité 5'. Les protéines virales nouvellement synthétisées s'assemblent au niveau des membranes plasmiques des cellules infectées en vue du bourgeonnement des virions. Les protéines de la membrane cytoplasmique sont exclues de la région de bourgeonnement et remplacées par les protéines H, N et F en face externe et la protéine M en face interne. Les nucléocapsides s'évagent et les particules virales ainsi néoformées quittent la cellule par bourgeonnement (figure 16). En culture, les paramyxovirus provoquent la formation de syncytiums, l'infection peut donc s'étendre. (M S. Harrison and al. 2010).

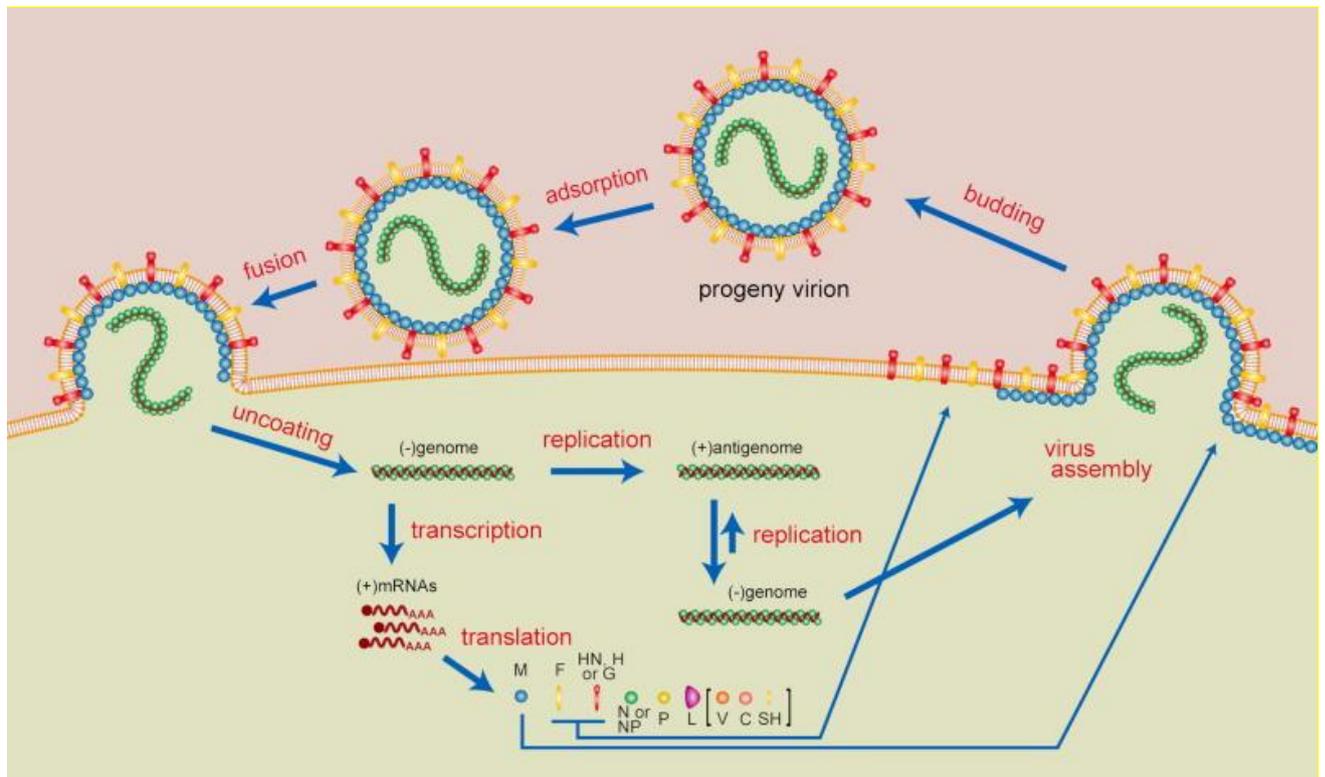


Figure 18 : Schéma du cycle réplcatif des paramyxovirus. (M S. Harrson and al. 2010).

Il est utilisé non seulement en tant que virus vivant mais également sous forme d'oncolysats. Tous comme les réovirus et les parvovirus, ce virus est très sensible à la voie IFN/PKR c'est pourquoi il a un tropisme naturel pour les cellules tumorales déficitaires en interféron. (Szelechowski et Saib, 2005).

2. Données actuelles

En 2017, H. Sui et ses collègues réalisent une étude sur l'efficacité du virus de la maladie de Newcastle génétiquement modifié (NDV-D90) sur des tumeurs gastriques. Trois lignées de cellules de cancers gastriques sont greffées sur des souris immunodéprimées. Les animaux sont ensuite traités à diverses doses de NVD-D90 par voie intratumorale. (H. Sui and al. 2017)

Cette étude montre que le NDV-D90 induit l'apoptose des cellules cancéreuses gastriques de manière dose-dépendante. Une réduction prononcée de l'invasion cellulaire a également été détectée notamment sur les cellules cancéreuses gastriques peu différenciées et hautement prolifératives. De plus, le NDV-D90 semble réduire la vascularisation de la tumeur gastrique.

Bien que cette étude ait étudié les effets du NDV-D90 sur les cellules cancéreuses gastriques humaines, l'environnement de la tumeur était chez la souris. L'état d'immunodéficience des souris nues peut également avoir un effet sur l'interprétation des données. Des études ultérieures pourraient être réalisées sur des patients humains afin de surmonter ces

limitations. Cependant, les données suggèrent que le NDV-D90 pourrait avoir des effets anticancéreux potentiels sur le cancer gastrique. (H. Sui and al. 2017)

e) Les Circoviridae

1. *Structure et génome*

Le virus de l'anémie du poulet (CAV), est l'un représentant des circovirus en virothérapie oncolytique.

Il s'agit d'un virus à symétrie icosaédrique, non enveloppé de 25 nm de diamètre (l'un des plus petits virus aviaires). Son génome est un ADN circulaire simple brin négatif de 2,3 kb codant pour 3 protéines virales : VP1, VP2 et VP3 (également appelées apoptines).

VP3 et en moindre mesure VP2 induisent l'apoptose des cellules infectées. VP2 induit l'apoptose dans les cellules normales et tumorales alors que VP3 induit une apoptose indépendante de *p53* spécifique de cellules tumorales. Dans les cellules tumorales, l'apoptine est phosphorylée et principalement nucléaire, alors que dans les cellules normales, elle est non phosphorylée, cytoplasmique et devient facilement neutralisée. Le mécanisme d'action de l'apoptine est encore peu connu. (PK Singh and al. 2012).

En 1995, SM Zhuang et son équipe ont montré que l'apoptine peut également entraîner la mort cellulaire dans les cellules d'ostéosarcome humain, exprimant la protéine *p53* sauvage, mutée ou même n'exprimant pas *p53*. Ils ont également constaté que la localisation dans le noyau de l'apoptine semble être importante pour une induction optimale de l'apoptose. L'induction d'une mort cellulaire indépendante de *p53* dans les cellules tumorales humaines fait de l'apoptine est donc du virus de l'anémie du poulet un candidat potentiel de virothérapie oncolytique. Aucun essais clinique de virothérapie oncolytique n'a, à ce jour, été mené avec un circovirus.

B. Virus génétiquement modifiés

a) Les adénovirus

2. *Structure et génome*

Les adénovirus sont des virus non enveloppés avec une capsid icosaédrique d'un diamètre d'environ 80nm. Ils ont un ADN bicaténaire, linéaire, non segmenté d'environ 36kb, subdivisé en une centaine d'unités de transcription dont certaines peuvent être supprimées et remplacées par un ADN étranger. On peut les retrouver chez tous les vertébrés.

Le cycle répliatif des adénovirus (figure 17) débute par la liaison entre certaines fibres virales et un récepteur cellulaire CAR permettant ensuite l'endocytose du virus dans la cellule. Dans l'endosome, le virus perd sa capsid, révélant ainsi le génome viral. Cette modification permet à la fois, la lyse de l'endosome et la pénétration du génome viral dans le noyau. Une fois dans le noyau, l'ADN viral est répliqué et transcrit sans s'intégrer au génome cellulaire. La traduction des ARN entraîne la formation des protéines virales non structurales puis structurales. La formation de nouveaux virions a lieu dans le cytoplasme. Les descendants viraux sont libérés lors de la lyse de la cellule hôte. Le cycle répliatif du virus est rapide : 20 à 24h. (Hakarainen et Hemminki, 2005).

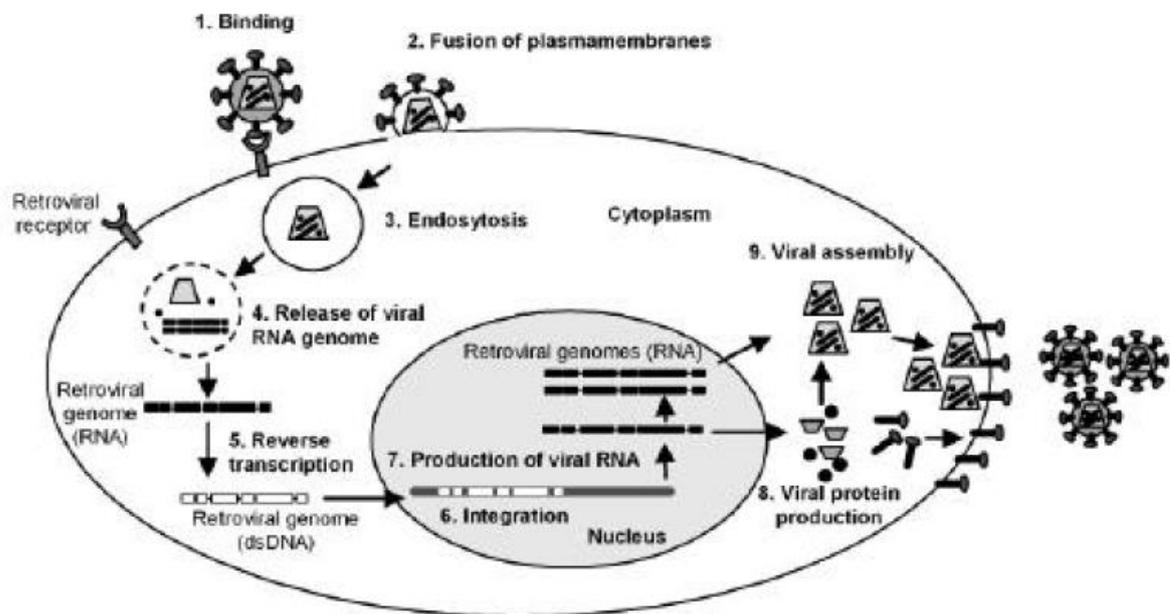


Figure 19 : Cycle répliatif d'un adénovirus (Hakarainen et Hemminki, 2005).

Les adénovirus font partie des virus les plus prometteurs en virothérapie oncolytique. En effet, ils possèdent de nombreuses caractéristiques du virus oncolytique « idéal » décrit précédemment (Hakarainen et Hemminki, 2005) :

- Leur matériel génétique est stable et facilement manipulable car ce sont des virus à ADN bicaténaire.
- L'insertion de transgène y est facilitée et sécurisée par une connaissance assez approfondie de leur génome. Celui-ci malgré le fait qu'il s'exprime dans le noyau, ne s'intègre pas à l'ADN cellulaire. Cette non insertion réduit les risques de mutation ou d'insertion du transgène dans une zone inactive.
- Le cycle cellulaire induit la lyse de la cellule infectée pour permettre la libération des nouveaux virions.
- Les adénovirus sont des virus peu pathogènes pouvant infecter un large spectre de vertébrés.

Les adénovirus sont utilisés en virothérapie oncolytique pour leur oncolyse directe mais aussi comme vecteur de transgènes. Pour cela, des modifications génétiques permettant un ciblage des cellules tumorales sont nécessaires car ces virus n'ont aucun tropisme tumoral naturel.

Comme expliqué précédemment, plusieurs modifications sont possibles pour rendre un virus spécifique des cellules tumorales. Chez les adénovirus, la voie de *p53* par délétion des gènes viraux E1A et E1B, permettant l'inhibition de l'apoptose des cellules infectées, et la voie anti-apoptotique sont les plus utilisées. Les adénovirus oncolytiques peuvent donc infecter toutes les cellules mais se répliquer et lyser uniquement les celles tumorales.

3. Données actuelles

Le premier virus oncolytique a été commercialisé en 2005 en Chine pour le traitement du carcinome épidermoïde de la tête et du cou réfractaire aux autres traitements. C'est l'adénovirus oncolytique recombinant H101, déposé sous le nom déposé d'ONCORIN® et utilisé en combinaison avec de la chimiothérapie. Ce virus est modifié par la double délétion des gènes viraux *E3* et *E1B*.

L'ONYX-015 est l'adénovirus le plus étudié et le premier à avoir été utilisé en essais cliniques. Il possède une délétion dans la région de E1B empêchant l'expression de la protéine E1B55K fonctionnelle. Cette protéine permet normalement, grâce à sa liaison avec *p53*, de l'inactiver. Dans les cellules saines, *p53* s'active lors de l'infection virale et entraîne l'arrêt de croissance et l'apoptose de la cellule. L'ONYX-015 ne peut donc se répliquer que dans les cellules présentant un déficit en *p53* donc dans les cellules tumorales.

Les études cliniques de phase I et II, ont montré que l'ONYX-015 se réplique uniquement dans les cellules tumorales et n'a pas d'effet secondaire majeur. Cependant, quelle que soit la voie, l'injection de l'ONYX-015 seul sur divers cancers ne montre pas d'effet anti-tumoral significatif et ne permet pas une amélioration clinique des patients. En revanche, la combinaison d'ONYX-015 avec de la chimiothérapie se révèle plus prometteuse : des réductions allant jusque 50% de la taille de la tumeur ont été constatées mais aucune prolongation significative de la médiane de survie n'a été mise en évidence. (Hakarainen et Hemminki, 2005).

b) Les herpesvirus

4. *Structure et génome*

Les herpesvirus sont des virus enveloppés à symétrie icosaédrique d'environ 15nm. Leur génome est sous forme d'un ADN bicaténaire, linéaire, non segmenté de 125 à 250kb (figure 18).

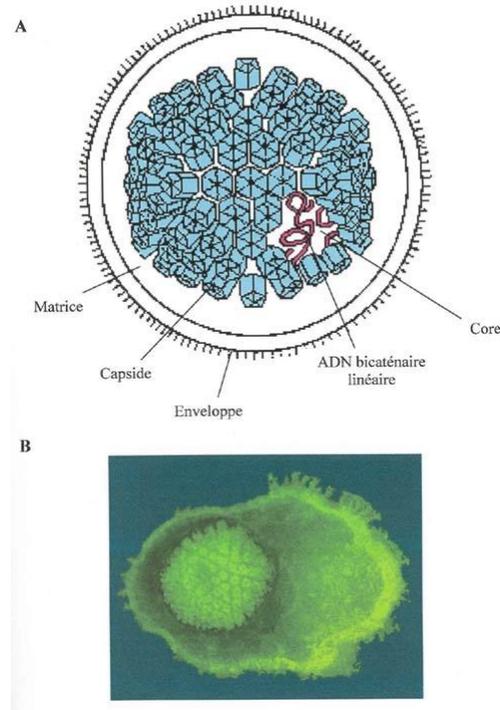


Figure 20 : Structure d'un herpesvirus (S. Collot-teixeira, 2003).

L'herpès simplex virus 1 (HSV-1) est l'herpesvirus le plus prometteur en virothérapie oncolytique.

C'est un virus enveloppé possédant un tégument et une capside icosaédrique. Son génome est de 150kb pour 84 gènes. L'HSV-1 possède, à la surface de son enveloppe, plusieurs glycoprotéines permettant une interaction avec la cellule hôte, la fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule. Ces protéines sont l'héparine sulfate, la nectine-1, la PILR α et le médiateur d'entrée des herpesvirus (HVEM).

Lors de l'entrée dans la cellule (figure 19), le tégument, composé de plusieurs protéines comme ICP0, ICP4 et Us11, se fragmentent dans le cytosol préparant la cellule hôte pour la réplication virale.

La capside est ensuite transportée dans le noyau où la réplication virale démarre.

Le cycle lytique de l'HSV-1 se déroule en trois étapes. La première étape permet l'expression des gènes précoces immédiats (IE).

Ces gènes codent pour 5 protéines permettant :

- la régulation de gènes précoces et tardifs
- le désarmement de certaines fonctions du système immunitaire inné et adaptatif permettant au virus de passer à la deuxième étape de son cycle.

La deuxième étape permet la transcription des gènes précoces (E) qui sont principalement impliqués dans la réplication du génome viral.

La dernière étape consiste à la transcription des gènes tardifs (L).

Les nouveaux génomes viraux sont assemblés au sein du noyau pour former des descendants viraux, libérés lors de la lyse de la cellule infectée.

Le cycle viral, de l'infection à la lyse cellulaire, prend entre 8 et 24 heures. (Peters et Rabkin, 2015).

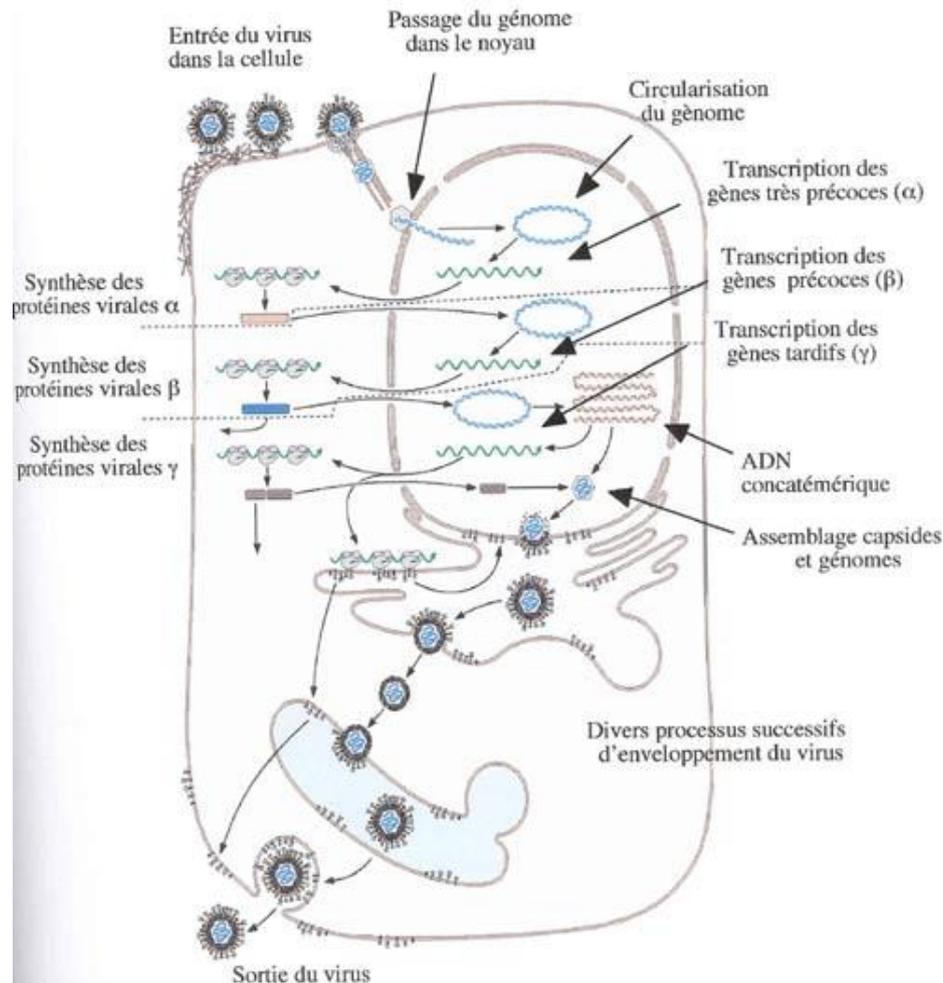


Figure 21 : Cycle réplcatif d'un herpesvirus (S. Collot-teixeira, 2003)

Cette description du virus nous montre qu'il possède plusieurs caractéristiques pouvant en faire un virus oncolytique prometteur :

- Il est facilement manipulable génétiquement car il contient plusieurs gènes non essentiels à sa croissance. Ce qui permet l'insertion de transgènes sans modification de la capacité du virus à se répliquer.
- Il peut infecter un grand spectre de cellules
- Il est sensible aux traitements antiviraux
- Il possède des protéines de fusions qui peuvent être modifiables pour permettre un ciblage des cellules cancéreuses.

5. Données actuelles

Talimogene laherparepvec (T-Vec) est le premier virus oncolytique ayant eu une autorisation de mise sur le marché en Europe, aux Etats-Unis et en Australie. Plus connu sous le nom déposé d'IMLYGIC®, il est utilisé depuis 2015 en monothérapie lors de mélanomes agressifs et/ou non résecables. En effet, l'essai de phase III a montré que des injections intra tumorales de T-Vec chez les patients atteints de mélanome malin à un stade avancé peuvent non seulement arrêter la croissance des tumeurs mais également agir de manière systémique et prolonger l'espérance de vie des patients. (H. Fukuhara and al. 2016)

T-Vec est un HSV-1 génétiquement modifié ayant pour base la souche JS-17 responsable de boutons de fièvre chez l'homme. Les modifications génétiques ont permis un ciblage des cellules tumorales, une diminution de sa pathogénicité et une augmentation de son immunogénicité.

Les gènes viraux ICP 34.5 ont été délétés et remplacés par le gène *hGM-CSF* sous contrôle d'un promoteur spécifique. Cette délétion empêche la réplication virale neuronale diminuant ainsi la pathogénicité neurologique du virus. L'insertion de *hGM-CSF*, augmente l'immunogénicité et la réponse anti-tumorale.

Lors du développement du virus, une autre modification génétique a également été effectuée : la délétion du gène *ICP47* permettant la présentation antigénique. Cette délétion entraîne le placement du gène *US11*, permettant une réplication spécifique aux cellules tumorales, sous contrôle d'un promoteur précoce immédiat. (H. Rehman and al. 2016)

c) Les Poxviridae

Les poxvirus sont des virus enveloppés ayant une nucléocapside isométrique. Leur génome est sous forme d'ADN double brins, linéaire allant de 135 à 300 kpb.

Les poxvirus sont classés en deux sous familles : les entomopoxvirinae pour ceux infectant les sarthropodes et les chordopoxvirinae pour ceux infectant les vertébrés. Au sein des chordopoxvirinae, le genre *Orthopoxvirus* regroupe les principaux virus pathogènes humains : le virus de la variole, le virus monkeypox et le virus cowpox.

Dans la famille des poxvirus, les recherches sont principalement axées sur deux virus : le virus de la myxomatose génétiquement modifié (MYXV) et le virus de la vaccine (VV).

Le virus de la vaccine a été développé précédemment.

Le MYXV, quant à lui, est un vecteur prometteur car il n'est pathogène ni chez les carnivores domestiques ni chez l'homme et n'a donc aucune immunité pré acquise chez ces espèces. Il est également facilement modifiable et capable d'infecter les cellules cancéreuses humaines.

Il a été montré que le MYXV est capable d'infecter des tumeurs gliales *in vivo*, et de permettre une augmentation du temps de survie chez des modèles murins xéno greffés. De plus, le MYXV délété sur le gène *serp2* (gène inhibant l'interleukine 1 β , dont la délétion entraîne une réaction inflammatoire plus rapide et donc une diminution de la virulence du virus) est capable de se répliquer et d'entraîner des effets cytopathiques dans plusieurs tumeurs canines primaires.

D'autres poxvirus ont également été explorés comme agents oncolytiques pour les tumeurs canines. Des études pré-cliniques ont montré une activité anti-tumorale du virus de la variole du canari recombinant (ALVAC) exprimant des interleukines 2. Suite à cette découverte, l'effet d'ALVAC chez les chiens atteints de cancer a été analysé cliniquement. L'administration intratumorale de ce poxvirus recombinant chez les chiens atteints de mélanomes a révélé une distribution localisée du virus dans le tissu tumoral. (S. Patil and al. 2012)

En 2003, TM. Jourdiier et son équipe, utilise le virus du canarypox ALVAC exprimant l'IL2 féline comme immunomodulateurs local dans le traitement de fibrosarcome spontané chez des chats domestiques. L'objectif est d'étudier l'efficacité de l'injection de virus du canarypox ALVAC dans la prévention des récives de fibrosarcome félin. Le virus est injecté autour des cicatrices chirurgicales après résection du fibrosarcome et radiothérapie à base d'iridium. Les injections de virus ont été bien toléré avec comme seul effet secondaire, une inflammation locale auto-limitante. En l'absence d'immunothérapie, une récive a été observée chez 61% des animaux au cours de 12 mois après traitement chirurgical et

radiothérapie. En revanche, seulement 28% des chats recevant l'IL2 féline ALVAC ont présenté des récurrences tumorales dans l'année suivant l'exérèse chirurgicale. L'injection de virus permet locale la production d'IL-2 provoquant une réponse immunitaire anti tumorale locale. L'avantage de cette thérapeutique est la réduction du risque de toxicité systémique grâce à l'action locale des injections.

En 2015, D. Jas et son équipe cherche à approfondir l'efficacité de l'immunothérapie à base d'ALVAC IL-2 chez les chats atteints de fibrosarcomes. Sur le même modèle, les chats de l'étude ont une résection chirurgicale de la tumeur puis une chimiothérapie à base d'iridium. Ils sont ensuite répartis aléatoirement en un groupe contrôle, un groupe recevant de l'ALVAC IL-2 à faible dose ($10^{6,5}$ dose infectante de 50% des ELISA) et enfin un groupe recevant de l'ALVAC IL-2 à forte dose ($10^{8,3}$ dose infectante de 50% des ELISA). Une augmentation significative ($p = 0,046$) de la période sans récurrence est notée chez les chats traités (médiane supérieurs à 730 jours) par rapport aux chats non traités (médiane de 230 jours). Aucune différence n'a cependant été observée entre les groupes traités à faible dose et à forte dose. Le traitement a été bien toléré et aucune toxicité n'a été observée chez les animaux traités à faible et à forte dose.

En 2014, en Europe l'immunothérapie ALVAC féline IL-2 devient officiellement un traitement adjuvant à la chirurgie pour réduire le risque de récurrence tumeur locale chez les chats atteints de fibrosarcome (Merial SAS, Lyon, France).

En 2015, le Département américain de l'Agriculture (USDA) autorise l'ALVAC félin IL-2 (Merial Inc., Duluth, GA, USA). Les indications de traitement incluent les chats atteints de fibrosarcome (2–5 cm de diamètre) sans signe de métastase ganglionnaire. Des recherches supplémentaires sur l'innocuité et l'efficacité d'ALVAC IL-2 sont en cours (CF. Saba, 2017).

d) Les Rétroviridae

6. Structure et génome

Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui peuvent être subdivisés en 3 catégories : oncoretrovirus, lentivirus et spulavirus.

Leur génome est constitué de deux copies d'ARN monocaténaire de 8 et 12kb entourées d'une nucléocapside. Chaque copie se termine par de longue répétition terminale (LTR). Le génome contient trois gènes essentiels :

- *gag*, codant la glycoprotéine de l'enveloppe virale,
- *pol*, codant la reverse transcriptase
- *env* codant la glycoprotéine de l'enveloppe et permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Les lentivirus peuvent avoir des gènes en plus codant pour des protéines nécessaires à leur réplication.

Le cycle répliatif viral (figure 20) commence par l'attachement d'une glycoprotéine de l'enveloppe virale sur un récepteur. Cette liaison provoque la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme. Une fois libéré, l'ARN viral simple brin est dupliqué en un ADN bicaténaire grâce à la reverse transcriptase virale.

Cet ADN néoformé est ensuite transféré dans le noyau où il s'intègre au génome de la cellule hôte. La machinerie de la cellule hôte permet alors la production d'ARN et de protéines virales qui, après assemblage dans le cytoplasme, donnent de nouveaux virions. Ces descendants cellulaires sortent de la cellule par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique. (Hakkarainen et Hemminki, 2005)

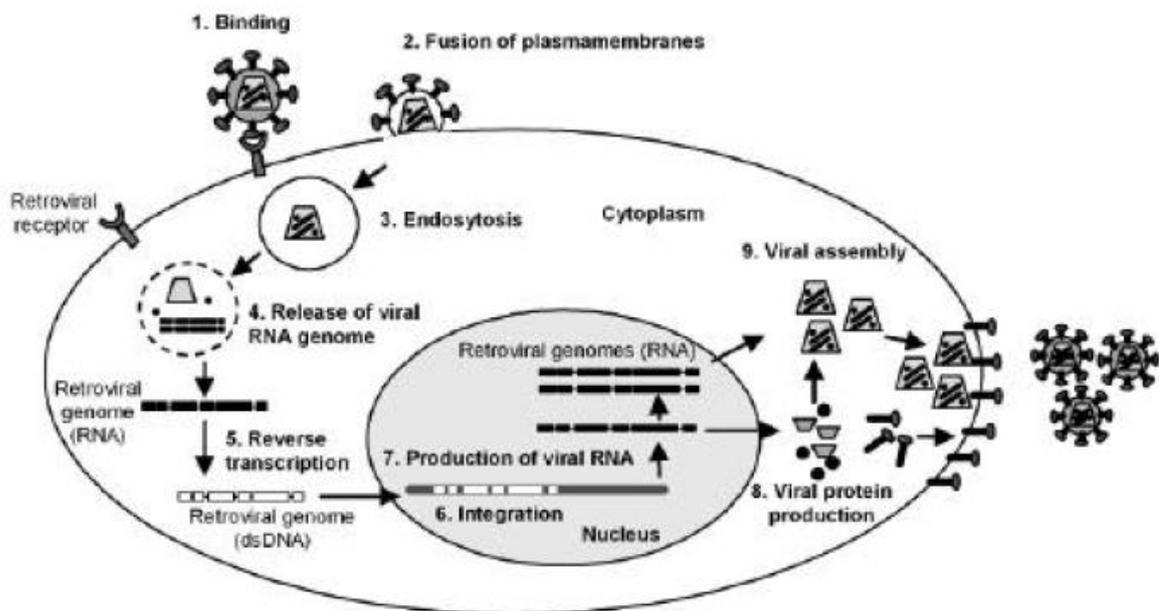


Figure 22 : Cycle répliatif des rétrovirus. (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

Les rétrovirus ont été les premiers virus à être utilisés dans les études cliniques humaines.

Plusieurs paramètres ont entraîné leur large utilisation (Hakkarainen et Hemminki, 2005) :

- Leur génome est assez simple ; ce qui rend les manipulations requises pour la production des vecteurs viraux plus aisées.
- Leur capacité à s'intégrer dans le génome de la cellule hôte peut assurer une expression à long terme des transgènes dans les cellules cibles. Cette intégration ne permet cependant pas toujours une expression stable du transgène et peut augmenter le risque de mutation par insertion.
- Les rétrovirus n'engendrent pas de fortes réponses immunitaires ce qui réduit leur cytotoxicité et permet une réadministration.

Ces virus sont cependant rapidement dégradés par le complément.

Les principaux facteurs limitants dans leurs utilisations (sauf pour les lentivirus) sont l'incapacité à être traduits dans les cellules en phase de repos et en titre important. L'ajout d'un promoteur CMV en région 5' et la modification des glycoprotéines virales permettent d'augmenter la stabilité des virions et donc leur titre. Malgré cela, la concentration en rétrovirus reste bien inférieure à celle possible avec des adénovirus par exemple.

Du fait de la petite taille de leur génome, les rétrovirus ne peuvent accueillir des transgènes de plus de 8 kpb.

La totalité des gènes viraux sont remplacés par le transgène et son promoteur. Des constructions séparées sont nécessaires pour apporter les protéines essentielles au cycle viral. Cet apport externe de protéines augmente la sécurité d'utilisation de ces virus qui ne peuvent se répliquer de manière indépendante.

7. Données actuelles

L'utilisation des rétrovirus est surtout focalisée sur les maladies génétiques pour lesquelles une expression stable et de longue durée du transgène est requise.

Plusieurs études cliniques en médecine humaine ont cependant porté sur les cancers.

Du fait de l'incapacité des vecteurs rétroviraux à être transduits dans les cellules non prolifératives, la thérapie par gène suicide a été étudiée, notamment dans les traitements de tumeurs cérébrales et pulmonaires. (Hakkarainen et Hemminki, 2005).

En conclusion, une grande diversité de virus peut être utilisée en virothérapie oncolytique. Chaque famille virale possède des avantages et des inconvénients (Tableau 2). L'un des objectifs actuels est d'étudier le type de virus le plus efficace dans le traitement des différents types de cancer.

Virus	Souche	Avantages	Inconvénients
Adénovirus	CAV1 CAV2	Infection des cellules peu importe le cycle cellule. Titre important dans les tissus tumoraux. Induction d'une réponse immunitaire. Transfert de gène efficace.	Immunité canine pré-existante
Virus de la maladie de carré	CDV	Tropisme tumoral naturel. Bonne tolérance.	Données uniquement sur le traitement du lymphome
Virus de la vaccine	GLV-1h68	Large gamme d'hôte. Virus atténué par l'insertion de trois cassettes. Capacité importante de recombinaisons génétique. Absence de risque d'intégration du génome viral par l'hôte.	Induction d'une réponse immunitaire à médiation virale
	LIVP	Virus atténué par une mutation naturelle du gène de la thymidine kinase. Sécurité bien connue de ce virus. Large gamme d'hôte. Réplication uniquement dans le cytoplasme, absence de risque d'intégration du génome viral.	Testé uniquement chez les chiens atteints de sarcomes des tissus mous
Virus du canarypox	ALVAC	Réponse immunitaire sans adjuvants. Approuvé par l'USDA comme un vaccin contre la maladie de carré (Recombitek)	Vaccin recombinant assurant une protection contre la maladie de carré uniquement

Tableau 2: Avantages et désavantages des différents virus dans le traitement des cancers canins (S.Patil and al. 2012).

Un grand nombre d'essais cliniques sont actuellement en cours sur divers virus. Le tableau 3 nous permet un aperçu des essais les plus aboutis.

Virus	Voie d'administration	Phase	Maladie	n	Description	Année
Adénovirus	Intratumorale (<i>i.t</i>)	Ib/II	Tumeur solide avancée	60 - 115	Evaluation de la réponse immunologique et de la tolérance des patients traités avec une ou plusieurs doses de divers virus oncolytiques	2013
	Subcutaneous (<i>s.c</i>)	I/II	Cancer colorectal	32	Etude de tolérance et de la réponse immunitaire lors d'injection à dose croissance d'Ad5 dans une cohorte d'expansion	2013
	<i>i.t</i>	I	Tumeur solide avancée	9	Etude de tolérance et de la réponse immunitaire du CD40L chez des patients atteints de cancers avancés	2012
	Intravésicale (<i>i.v</i>)	I	Cancer vésicaux	35	Etude d'établissement de la posologie de CG0070	2012
Reovirus	<i>i.v</i>	Ib	Cancer colorectal	10	Etude de démonstration des principes chez des patients avec des métastases hépatiques	2012
	<i>i.v</i>	I	Tumeur solide avancée	36	Evaluation de l'action du cyclophosphamide dans l'optimisation de l'acheminement des virus oncolytiques	2015
	<i>i.t</i>	I	Gliome	15	Etude de tolérance et d'établissement de la posologie	2014
	<i>i.v</i>	Ib	Gliome récurrent / Tumeurs cérébrales métastasées	12	Evaluation de la réponse immunitaire et de la pharmacocinétique des virus oncolytiques avant exérèse chirurgicale.	2014
	<i>i.v</i>	I/II	Tumeur solide avancée, cancer de la tête et du cou	31	Etude d'établissement de la posologie du virus en association avec de la carboplatine et du paxclitaxel	2012
	<i>i.v</i>	I	Tumeur solide avancée	16	Association du virus oncolytique et de la gemcitabine	2011
	<i>i.v</i>	I	Tumeur solide avancée	24	Association du virus oncolytique et du docetaxel	2010
	<i>i.t</i>	I	Tumeur solide avancée	23	Association du virus oncolytique et de la radiothérapie	2010
	<i>i.v</i>	II	Mélanome	21	Evaluation de la tolérance et de l'efficacité	2012
	HSV	<i>i.t</i>	III	Mélanome	436	T-Vec vs GM-CSF chez des patients atteints de mélanome non résecable chirurgicalement
<i>i.t</i>		Ib	Mélanome	19 (en cours)	Association du T-VEC et de l'inhibiteur de contrôle ipilimumab	2014
<i>i.t</i>		I	Glioblastome multiforme	9	Association du virus oncolytique et de la radiothérapie pour les récives de glioblastome	2014
<i>i.t</i>		I/II	Cancer de la tête et du cou	17	Association de T-Vec, de radiothérapie et de cisplatine avant exérèse chirurgicale	2010
Virus de la vaccine	<i>i.t</i>	I	Carcinome hépatocellulaire	30	Etude d'établissement de posologie de JX-594	2013
Virus de la vaccine/Virus de la variole	<i>s.c</i>	I	Cancer de la prostate	30	Association de l'ipilimumab et de PROSTVAC-VF ciblant les antigènes spécifiques de la prostate	2012
	<i>s.c</i>	II	Cancer de la prostate	125	PROSTVAC-VF et GM-CSF vs Placebo	2010
VSV	<i>i.t</i>	II	Carcinome hépatocellulaire et cholangiocarcinome	12 (en cours)	VSV avec insertion de beta interféron chez des patients atteints de cancer hépatique métastasé.	2015

Tableau 3 : Sélection d'essais cliniques récemment publiés en virothérapie oncolytique. (S. Turnbull and al. 2015).

Actuellement, aucun traitement utilisant un virus oncolytique n'a obtenu une autorisation de mise sur le marché en médecine vétérinaire. Cependant, une dizaine de virus oncolytiques sont en phase d'essais cliniques. Le plus prometteur est, pour le moment, l'adénovirus Onyx-015 dont nous avons déjà parlé précédemment et qui est en étude de phase III. L'adénovirus CV706, le virus de la maladie de Newcastle PV et l'Herpès Simplex Virus de type 1 GV207 sont également dans les virus les plus étudiés et les plus aboutis. (M. Szelechowski A. Saïb, 2005).

IV) Les tumeurs canines : un bon modèle en médecine translationnelle

A. Des modèles cellulaires et murins incomplets

L'un des inconvénients majeurs des modèles murins est leur immunodéficiência. D'une part, les tumeurs sont implantées sur des souris porteuses et ne reflètent donc pas le développement de tumeurs naturelles.

D'autre part, l'immunodéficiência de ces modèles, nécessaire à la greffe de tumeurs, interdit les études des interactions de la thérapie avec le système immunitaire de l'hôte ; interaction qui joue un rôle majeur dans l'efficacité thérapeutique du virus. De ce fait, de nombreux virus échouent dans les essais humains en raison de leur toxicité ou de leur inefficacité malgré des essais murins satisfaisants. De plus, certaines souches de virus oncolytiques tels que l'adénovirus humain et la vaccine virus ne se reproduisent pas dans les cellules de souris.

C'est pourquoi il y a un réel besoin de modèles permettant de mieux prévenir l'efficacité clinique, l'innocuité et la toxicité des nouvelles thérapies anticancéreuses. L'étude des tumeurs spontanées canines pourrait être une solution.

B. Des tumeurs canines semblables aux tumeurs humaines.

L'augmentation non négligeable de l'espérance de vie moyenne de nos chiens domestiques fait qu'ils vivent assez longtemps pour développer des cancers de façon spontanée. En effet, les chiens présentent aujourd'hui des cancers spontanés aussi divers et fréquents que chez les humains. L'incidence des cancers canins est de 1 à 2% et la moitié des chiens de plus de 10 ans décèdent des suites d'un cancer. (DF. Merlo and al. 2008)

Les tumeurs canines ressemblent aux tumeurs humaines de par leur biologie, leur aspect histologique, leur présentation clinique, leur réponse aux traitements ainsi que l'évolution des métastases et leur résistance aux thérapies.

Ces nombreux facteurs font des cancers canins un bon modèle d'étude translationnelle des cancers humains.

a) Environnement tumoral

Le chien de compagnie partage notre environnement et notre mode de vie. Il vit généralement dans notre jardin et dans notre maison voire même dans notre chambre. Il est donc soumis à la même pression environnementale que ce soit au niveau des pesticides, des divers polluants ou des UV. De nombreux chercheurs estiment que c'est une sentinelle de l'effet de l'environnement sur notre santé.

Un animal sentinelle est défini comme un « organisme pour lequel les modifications induites par une contamination environnementale peuvent être mesurées, ces conclusions pouvant être appliquées à la santé humaine et permettant d'alerter de manière précoce de ces changements » (O'Brien et al., 1993).

Le chien partage donc les mêmes facteurs de risques environnementaux de cancers que l'humain. Cette similitude le distingue du modèle murin, souvent isolé dans un environnement confiné et sécurisé au sein d'une cage dans un laboratoire.

b) Incidence

Certains cancers canins peuvent présenter un intérêt non négligeable en recherche : leur fréquence. En effet, leur incidence peut être beaucoup plus élevée que chez l'homme. Ce qui permet de réunir un échantillon suffisamment grand pour réaliser des essais cliniques et observer des différences statistiques. Les ostéosarcomes, les sarcomes des tissus mous, les tumeurs mammaires sont des exemples de cancers plus fréquents en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine. (Withrow et al., 2012)

Ainsi, l'incidence de l'ostéosarcome est, chez le chien, estimée à 10 000 nouveaux cas par an aux États-Unis, soit 10 à 100 fois plus que chez l'enfant. (DM. Vail and EG Mac Ewen, 2000)

c) Systeme immunitaire

Contrairement aux modèles murins, les chiens sont dotés d'un système immun compétent. De plus, ce système immunitaire est physiologiquement proche de celui de l'Homme. Il est également soumis aux mêmes facteurs environnementaux (pathogènes, commensaux...). Ce qui est d'autant plus important que les chiens, comme les hommes, développent une mémoire immune suite aux expositions diverses et variées au cours de leur vie. Cette mémoire est, pour les deux espèces, dépendante des lymphocytes T. (Paoloni et Khanna, 2008)

d) Examen histologique

Certains cancers canins ont, sur le plan histologique, les mêmes caractéristiques que ceux humains. Il en devient même parfois difficile de les différencier sur une lame histologique. L'ostéosarcome, le lymphome, les tumeurs mammaires ont, par exemple, des modifications anatomopathologiques comparables chez les humains et les chiens.

Ces tumeurs présentent chez les deux espèces, la même hétérogénéité cellulaire caractéristique des cancers et rendant la chimiothérapie conventionnelle souvent peu efficace. (Withrow et al., 2012)

Certains cancers sont classés par le type histologique en grade permettant de définir un pronostique.

La similitude histologique entre l'Homme et le chien est telle que certaines classifications sont communes aux deux espèces. Le lymphome ou les tumeurs mammaires en sont des exemples. L'étude de l'unité "cancers Animaux Modèles pour la Recherche en Oncologie Comparée" (AMaROC) valide ainsi les tumeurs mammaires d'apparition spontanée de la chienne comme modèle d'étude pertinent des cancers du sein chez la femme, en particulier des cancers du sein triple-négatifs pour lesquels les cibles thérapeutiques restent à découvrir.

D'autres cancers tels que le mastocytome possèdent leurs propres classifications.

Lorsque la classification histologique est similaire, il est aisé de se dire que les facteurs pronostiques canins peuvent être facilement transposés à l'Homme. (Withrow et al., 2012).

e) Comportement biologique

Tout comme les cancers humains, les cancers canins ont la capacité d'envahir les tissus adjacents et de métastaser dans d'autres endroits de l'organisme. Le mécanisme de métastase est similaire, que ce soit au niveau des complexes de gènes, des protéines ou des sites préférentiels de métastase. (Withrow et al., 2012).

De nombreuses tumeurs canines comme le lymphome non-hodgkinien, le carcinome prostatique, le carcinome pulmonaire, le carcinome de la tête et du cou, les tumeurs mammaires, le mélanome ou l'ostéosarcome sont considérées comme de bons modèles de processus métastatiques humains. (Khanna et Hunter, 2005).

La complexité du mécanisme de métastase et de progression tumorale est trop importante pour les études *in vitro* ; des modèles *in vivo* sont donc nécessaires.

Cependant, les essais cliniques humains, notamment sur les enfants, rencontrent des difficultés éthiques. Pour certains cancers, la faible incidence des cas humains est également un obstacle car elle ne permet pas d'avoir des échantillons de taille suffisants. Chez l'homme, il peut également être compliqué de récupérer à la fois des échantillons de tumeurs primaires et de métastases, ce qui limite fortement la recherche sur les processus géniques des métastases.

L'ostéosarcome, en plus d'être plus fréquent chez le chien, présente également des délais d'évolution plus courts. La période de rémission après l'exérèse chirurgicale seule est de quatre mois et celle après l'exérèse et la chimiothérapie adjuvante de 11 mois seulement. Tous ces facteurs facilitent la réalisation d'études pertinentes sur le modèle canin. Ces études peuvent ensuite être transposées vers l'homme sans trop de modifications.

De plus, l'ostéosarcome est souvent plus agressif chez le chien et que chez l'humain. Une étude comparative de l'expression des gènes a donc permis de définir des gènes « dog-like » probablement à l'origine des métastases et de la progression du cancer. Ces gènes sont probablement corrélés à une réduction du taux de survie. (R. Gorlick et C. Khanna, 2010)

f) Réponse au traitement conventionnel

Les traitements oncolytiques conventionnels humains tel que la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie sont également disponibles en médecine vétérinaire. Des protocoles de chimiothérapie combinant plusieurs molécules cytotoxiques sont de plus en plus fréquemment mis en place chez nos animaux de compagnie. Les doses de ces molécules sont souvent réduites car la médecine vétérinaire cherche la rémission et non la guérison. Les

principes actifs utilisés chez les chiens sont cependant les mêmes que chez l'Homme et leurs spectres d'actions sont similaires. (Withrow et al. 2012).

Par exemple, dans le cadre du lymphome non-hodgkinien, les drogues cytotoxiques efficaces chez le chien (la vincristine, le cyclophosphamide, la doxorubicine, le mitoxantrone, la cytarabine arabinoside, le méthotrexate) sont les mêmes que chez l'homme. De la même manière, les molécules inefficaces sont les mêmes (gemcitabine, cisplatine, carboplatine) (M. Paoloni et C. Khanna, 2008).

La pharmacocinétique et le métabolisme des molécules anticancéreuses dans le modèle canin est beaucoup plus proche de celui de l'Homme que le modèle murin.

De plus, l'absence de traitement de référence ou « gold standard » en médecine vétérinaire autorise parfois l'utilisation de traitements en cours d'investigation. Ainsi, le chien participe activement à la mise en place et à la recherche de nouveaux traitements innovants et fait donc partie des premiers à en profiter.

g) Aspect génétique

Le séquençage complet d'un génome de chien a eu lieu pour la première fois en 2005 grâce au Dog Genome Sequencing Project.

Cette connaissance du génome canin et de ses régions fonctionnelles est importante pour l'oncologie comparée. En effet, cela a permis de constater que le génome canin est très proche du génome humain et que les maladies génétiques canines sont en général similaires à celles humaines. Le génome canin a notamment de grandes homologies avec le génome humain en ce qui concerne les gènes associés au cancer. (M. Paoloni et C. Khanna, 2008).

Lors d'ostéosarcome, par exemple, la mutation du gène *P53* est observée chez le chien et similaire à celle humaine. La perte de fonction de *P53*, très fréquente lors du cancer humain, intervient également dans de multiples cancers canins. (S. Mendoza et al. 1998).

Un autre exemple d'homologie génique est le carcinome urothélial invasif.

La moitié des patients atteints d'un cancer invasif de la vessie (carcinome urothélial invasif, «UIC») décèdent de leur cancer. La recherche de meilleures stratégies thérapeutiques est essentielle. Une découverte relativement récente sur les carcinomes urothéliaux invasifs est la présence de sous-types moléculaires (sous-types luminal et basal). Ces sous-types sont liés à l'agressivité du cancer et à leur réponse aux traitements.

Pour progresser dans la lutte contre les carcinomes urothéliaux invasifs, ces sous-types doivent être modélisés dans des études sur modèle animal. Ces recherches servent à sélectionner les nouveaux traitements les plus prometteurs pour les essais sur l'homme.

Cependant, il est difficile de reproduire ces sous-types combinés à d'autres caractéristiques clés dans les tumeurs induites expérimentalement. (D. Dhawan and al. 2018)

En 2018, D. Dhawan et son équipe ont effectué des analyses de séquence d'ARN de carcinomes urothéliaux invasifs d'origine naturelle chez le chien de compagnie (en les comparant à la vessie canine normale et aux données de séquençage chez l'homme). Ces recherches ont montré que les sous-types luminal et basal sont clairement présents dans les carcinomes urothéliaux invasifs canins. Ceci s'appuie sur des découvertes antérieures des similitudes entre les carcinomes urothéliaux chez le chien et chez l'homme en matière de pathologie, de comportement métastatique et de réponse aux chimiothérapies.

En conclusion, les résultats de cette étude fournissent des preuves convaincantes, confortant l'idée que le carcinome urothélial invasif canin est un modèle extrêmement pertinent de carcinome urothélial invasif humain pour la recherche translationnelle. Les essais cliniques canins peuvent être utilisés pour sélectionner les stratégies les plus prometteuses à intégrer dans les essais sur l'homme, bénéficiant ainsi aux humains comme aux chiens de compagnie. (D. Dhawan and al. 2008)

h) Vieillesse

Le vieillissement chez le chien est de 5 à 8 fois plus rapide que chez l'Homme permettant de voir les résultats du traitement à court, moyen et long terme.

En effet, l'espérance de vie des chiens ayant augmenté, la majorité d'entre eux vivent maintenant plus de 6 ans ce qui équivaut à plus de 60 ans chez l'Homme. Cette durée de vie permet donc de mener les études de manière plus rapide que chez les humains tout en ayant la possibilité d'observer les éventuelles rechutes ou effets secondaires à long terme. (L. Rowell et al. 2011).

En conclusion, le modèle canin est un bon modèle translationnel pour les cancers.

En effet, les cancers canins et humains possèdent de nombreux points communs aux niveaux génétique, histologique et biologique.

De plus, chez les deux espèces, l'initiation de la tumeur et la progression est influencée par des facteurs similaires comme l'âge, la nutrition, le sexe et l'exposition environnementale.

Les réponses aux traitements sont également souvent similaires.

Les vétérinaires sont également plus sensibles au coût, aux contraintes pratiques et à la faisabilité du traitement. Ces facteurs ne sont pas forcément pris en compte dans le contexte laboratoire.

C. Les limites du modèle canin

Il y a quelques limites à noter concernant ce modèle. A court terme, les études utilisant le modèle canin prennent plus de temps à compléter que les modèles murins. Le coût est également plus élevé et la quantité du traitement requise augmentée compte tenu de la taille des chiens par rapport aux souris.

De plus, l'épidémiologie des tumeurs canines et humaines n'est pas toujours comparable. En effet, les tumeurs plus fréquemment observées chez l'homme ne sont pas forcément les mêmes chez le chien.

De ce fait, le recrutement pour réaliser des études pourrait s'avérer difficile ou alors ces dernières seraient réalisées sur des petits effectifs résultant en un manque de puissance statistique. (Gordon *et al.*, 2009)

En médecine vétérinaire, une des principales causes d'échec thérapeutique est la non observance du traitement. De telles études requièrent une coopération et une confiance infaillible entre le propriétaire et le vétérinaire.

En conclusion, l'utilisation des chiens comme modèle de translation bénéficie aux deux parties. Le chien aura accès à des nouvelles thérapies à un faible coût voire gratuitement et les résultats obtenus chez les chiens seront directement applicables à des études cliniques humaines permettant un certain gain de temps.

Deuxième partie : étude expérimentale

Avant la réalisation d'étude d'efficacité et de tolérance sur des chiens de propriétaires atteints de tumeurs, diverses études doivent être réalisées.

En effet, les études pré cliniques sur modèle cellulaire et modèle murin sont nécessaires avant tout essai clinique. Ils permettent de vérifier l'efficacité *in vitro* et la sécurité d'emploi de la molécule (effets toxiques, modifications génétiques,...).

Ces études, réalisées avec le TG6002 ont mis en évidence une limitation de la croissance tumorale lors d'injection systémique à des souris immunocompétentes atteintes de carcinomes rénaux. (L. Fend *and al*, 2015). Ainsi qu'un effet synergique du TG6002 et du 5-FC sur des cellules de mélanomes humaines *in vitro*. (B. Heinrich *and al*. 2017) (T. Brennan, 2017)

La dernière étape avant de pouvoir étudier l'efficacité et la tolérance du TG6002 chez des chiens de propriétaires atteints de tumeurs est donc l'étude de tolérance, sur des chiens sains, de l'administration du virus d'une part et de l'administration du 5-FC d'autres part puis l'administration du TG6002 combiné à la 5-FC.

La première étude est séparée en deux phases. La première phase permet de définir la dose maximale tolérée par l'injection unique de dose croissante de TG6002. La seconde phase permet d'évaluer les effets secondaires lors d'injections répétées de TG6002 associée à de la 5-FC.

La seconde étude permet d'évaluer les effets secondaires lors d'administration quotidienne de 5-FC.

I) Objectifs

Les objectifs de ces études sont ainsi :

- Evaluer la tolérance du virus oncolytique de la vaccine TG6002 en injection unique chez des chiens Beagles sains
- Définir la dose maximale tolérée de TG6002
- Evaluer la tolérance du TG6002 en injection répétée couplé à l'administration de 5-FC chez des chiens Beagles sains
- Evaluer l'excrétion du vecteur virale dans l'environnement et les fluides corporels des chiens traités.
- Evaluer la tolérance du 5-FC chez des chiens Beagles sains
- Décrire la pharmacocinétique de la 5-FC administrée par voie orale

II) Considération éthique des effets secondaires

Les effets secondaires des deux études sont gradés d'après le Veterinary cooperative oncology group (2011).

Pour des raisons éthiques, lors de l'étude de tolérance du 5-FC, l'administration du produit est arrêtée en cas d'effet secondaire présenté ci-dessous.

Examen	Paramètres	Détails	Grade VCOG-CTCAE v1.1
Clinique	Signes gastrointestinaux (diarrhée, vomissements...)	Troubles digestifs nécessitant la mise en place d'un traitement en hospitalisation	Grade 3
Clinique	Signes dermatologiques (rash cutané, dépigmentation et dépilation de la truffe et du pourtour des yeux, scrotite)	Lésions cutanées intéressant 10-30% de la surface corporelle. Ulcération cutanée mineure.	Grade 2
Hémogramme	Neutropénie	< 1500 microL ⁻¹	Grade 1
Hémogramme	Thrombopénie	<50 000 microL ⁻¹	Grade 2
Hémogramme	Anémie	Ht < 20%	Grade 3
Biochimie	PAL	> 5 fois la limite supérieure de la valeur de référence	Grade 3
Biochimie	ALAT	> 4 fois la limite supérieure de la valeur de référence	Grade 3

Tableau 4 : Effet secondaire entraînant l'arrêt de l'administration du 5-FC

III) Matériel et Méthodes

A. Matériel

a) Etude de tolérance du TG6002

1. Chien

Les chiens utilisés pour cette étude sont des Beagles mâles en bonne santé provenant de BioVivo, (Harlan Laboratories, Gannat, France).

Durant l'étude, ils sont logés dans des cages en inox avec un sol en résine et une litière en copeaux de résineux à une température ambiante de 19°C+/-2°C. L'hygrométrie est d'environ 35% et le cycle nyctéméral de 12h/12h. Ils sont nourris par un repas, le matin, de croquette Royal Canin Adult Diet, dont la quantité est calculée par rapport à leur poids. L'eau est à volonté.

Lors de leur arrivée, les chiens ont un examen clinique complet, une numération formule sanguine et un examen biochimique 6 paramètres (Urée, Créatinine, Albumine, Protéine totales, PAL, ALAT) de manière à s'assurer de leur bonne santé. Ils restent ensuite 7 jours dans l'environnement pour s'acclimater avant le début de l'étude. Durant ce temps d'acclimatation, les chiens ont un examen clinique hebdomadaire et sont observés quotidiennement de manière à pouvoir détecter tout problème comportemental ou clinique incompatible avec l'étude.

L'identification des chiens se fait par un tatouage au niveau de l'oreille droite.

	Chien	Poids en kg
Injection simple	Chien 1	11,8
	Chien 2	11,6
	Chien 3	9,7
	Chien 4	10
Injections répétées	Chien 5	8,5
	Chien 6	10
	Chien 7	11,4

Tableau 5 : Poids des chiens inclus dans l'étude

2. TG6002

Le virus oncolytique utilisé est le TG6002. C'est un virus de la vaccine (souche Copenhague) recombinant. Comme expliqué précédemment il est délété en gènes *J2R* et *I4L* codant respectivement pour la thymidine kinase (TK) et la ribonucléotide réductase (RR). Le gène *FCU1* codant pour la cytosine deaminase a été inséré dans le locus de *J2R* sous contrôle du promoteur p11K7.5.

Ce virus est produit sur des cellules de fibroblaste d'embryon de poulet (CEF) dans les bâtiments de Transgène le 08 juillet 2015 au titre de 36×10^8 PFU/mL. Puis stocké à -80°C . Il est utilisé dans les deux heures suivant la décongélation ou la dilution.

3. 5-FC

La 5-FC est administrée sous forme de gélules Ancotil® (Meda Pharma, Paris, France) 500 mg reconditionnés en comprimés Ancotil® 100 mg.

b) Etude de tolérance du 5-FC

Pour cette étude, trois chiens de race Beagle en bonne santé (un mâle et deux femelles) provenant de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort sont hébergés au Centre de Recherche Biomédicale d'Alfort (CRBM).

Pendant le protocole, ils sont hébergés dans des box à barreau en inox, avec un sol en résine et une litière en copeaux de résineux à une température ambiante de $19 \pm 2^\circ\text{C}$. L'hygrométrie est supérieure à 35% et le cycle nyctéméral de 12h/12h. La ventilation est de minimum 10 renouvellements par heure avec un filtre G4 changé tous les 7 à 14 jours.

Les chiens reçoivent une alimentation et un abreuvement à volonté. Ils ont également des sorties régulières. L'environnement est enrichi en jeux.

Lors de leur arrivée, les chiens ont eu une période d'acclimatation d'au moins 7 jours. Durant cette période, les chiens ont subi un examen clinique hebdomadaire (comprenant notamment une pesée), ils sont également observés quotidiennement de manière à pouvoir détecter toute anomalie comportementale ou clinique incompatible avec l'étude.

Chien	Poids (kg)
Chien 8	11
Chien 9	16,9
Chien 10	15,4

Tableau 6 : Poids des chiens inclus dans l'étude de tolérance du 5-FC

B. Méthodes

a) Injections intramusculaires uniques de TG6002

La première phase de l'étude de tolérance est la détermination de la dose maximale tolérée en injection simple.

Pour cela, des injections intramusculaires de TG6002 sont réalisées à des doses allant de 1.0×10^6 PFU/kg à 5.0×10^7 PFU/kg chez 4 chiens beagles mâles sains (tableau 5). Le volume maximal des injections était de 0.5 mL/kg/injection dans les quadriceps ou les muscles lombaires. Les sites d'injection étaient au préalable tondu et désinfectés à l'alcool.

Les administrations aux différents chiens ont été espacées de 2 à 7 jours, afin de pouvoir observer les éventuels effets secondaires.

Animal	Dose de TG6002 injectée par chien (PFU/kg)	Dose injectée par chien (PFU)	Volume à injecter /kg	Volume total à injecter
Chien 1	1.0×10^6	11.8×10^6	2,78 µl (+ 1 mL NaCl 0.9%)	3,280 µl (+ 1 mL de NaCl 0.9%) = 0,032 mL + 1 mL de NaCl
Chien 2	5.0×10^6	5.8×10^7	13,89 µl (+ 1 mL NaCl 0.9%)	161,12 µl (+ 1 mL de NaCl 0.9%) = 0,16 mL + 1 mL de NaCl
Chien 3	1.0×10^7	9.7×10^7	27,78 µl	269,47 µl = 0,27 mL
Chien 4	5.0×10^7	8×10^8	138,88 µl	1388,8 µl = 1,39 mL

Tableau 7 : Dosage des injections intramusculaires simples de TG6002

Des échantillons de fluides corporels (sang, urine, salive et selles) sont collectés avant l'injection, 24h et 48h après l'injection.

Les chiens ont un examen clinique complet quotidien durant 15 jours à partir du début de l'étude. Cet examen inclut notamment le suivi du poids, la température rectale, les lésions cutanées, l'appétit et l'état général. Les manipulateurs doivent changer de gants après s'être occupé de chaque animal. En cas d'apparition de pustule, le chien doit être isolé jusqu'à disparition de la réaction.

Des examens hématologiques et biochimiques ont été réalisés au début et à la fin de l'étude (J0 et J14 pour les chiens 1 et 4, J0 et J11 pour le chien 2 et J0, J9 et J19 pour le chien 3). Les dates d'analyses ont varié en fonction des horaires et jours d'ouverture des laboratoires. (Figure 23, 24 & 25).

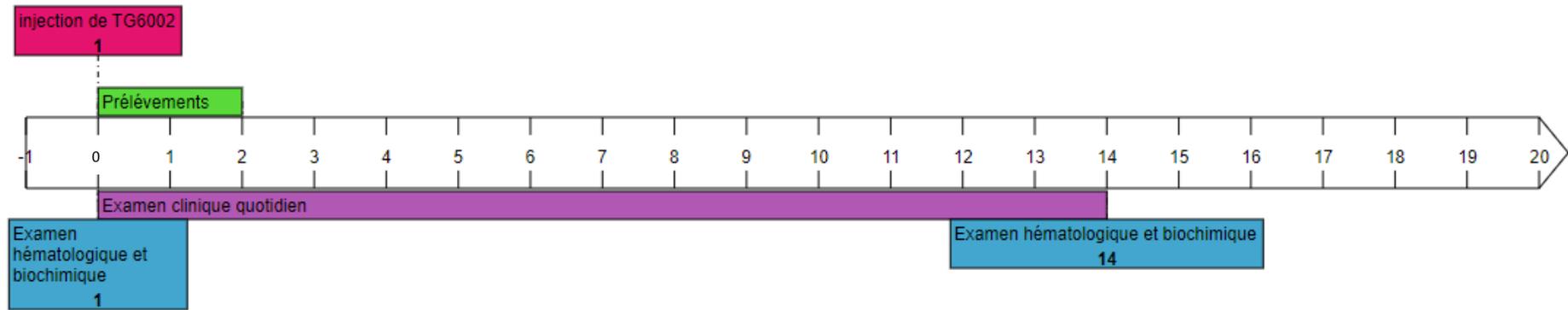


Figure 23 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 des chiens 1 et 4

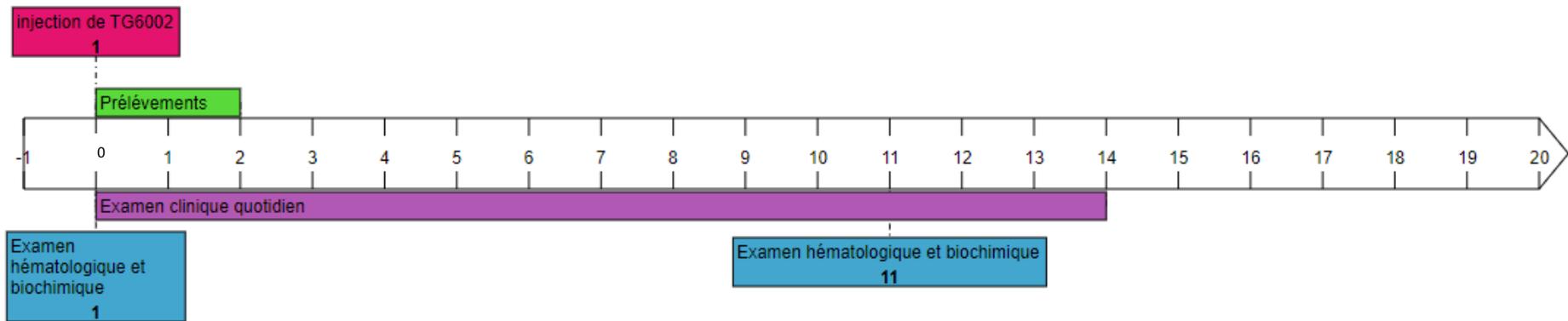


Figure 24 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 du chien 2

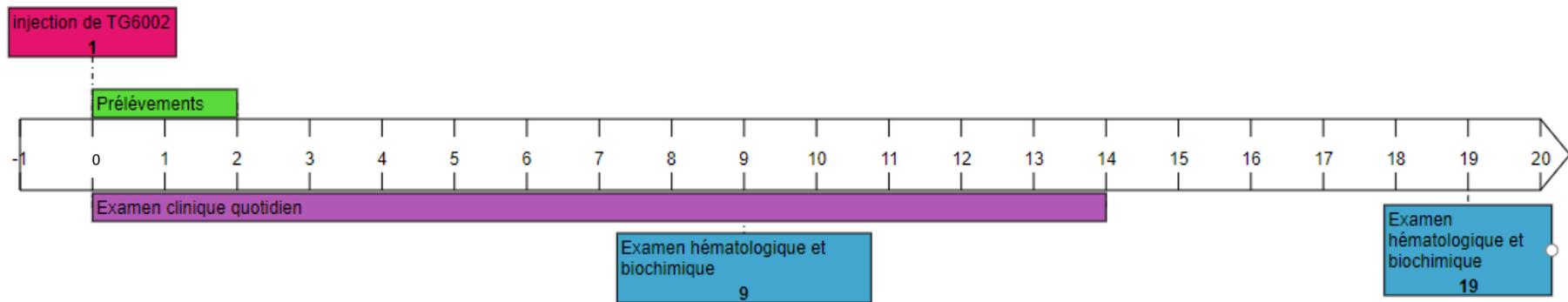


Figure 25 : Protocole d'étude de tolérance en injection unique du TG6002 du chien 3

b) Administration répétée de 5-FC

- Présentation générale de l'étude

La durée de l'étude est de 21 jours. Les chiens reçoivent quotidiennement par voie orale 100 mg/kg de 5-FC deux fois par jours (à 12h d'intervalle) durant quinze jours. Les gélules sont administrées dans une alimentation humide donnée à jeun.

Chien	Poids initial (en kg)	Quantité de 5-FC par prise
Chien 8	11	1100 mg
Chien 9	16.9	1700 mg
Chien 10	15.4	1500 mg

Tableau 8 : Quantité de 5-FC données bi-quotidiennement aux chiens en fonction de leur poids initial.

Un examen clinique complet des animaux est réalisé quotidiennement durant toute l'étude (de J0 à J21). Celui-ci comprend la mesure du poids, de la température rectale, et des mesures des paramètres vitaux (fréquence cardiaque et respiratoire).

L'état général de l'animal, la prise alimentaire et hydrique, la présence de troubles digestifs (vomissements et/ou diarrhée) sont renseignées. Enfin, la présence d'anomalie cutanée en regard du *planum* nasal, des oreilles, des babines, de la vulve et du scrotum est notifiée.

- Examens complémentaires

Par ailleurs, pour chaque chien, des examens biochimiques et hématologiques sont réalisés à J0, J7, J14 et J21. Pour cela, une prise de sang à la veine jugulaire (volume : 3 mL réparti en 1mL sur tube EDTA pour l'hémogramme et 1,5 mL sur tube sec pour la biochimie) est réalisée avant chaque analyse. L'ensemble des analyses sanguines sont réalisées au Biopôle (Ecole nationale vétérinaire d'Alfort).

La concentration sérique en 5-FC et 5-FU est évaluée à J0, J7, J14 et J21.

Le titrage en 5-FC et 5-FU nous permet d'une part de connaître la pharmacocinétique de la 5-FC administrée par voie orale et d'autre part de vérifier que la 5-FC n'est pas transformée en 5-FU sans la présence de TG6002.

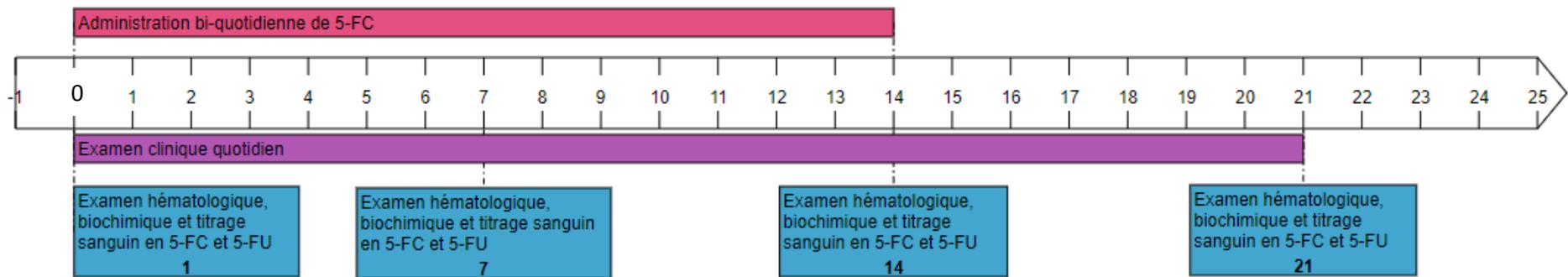


Figure 26: Protocole d'étude de tolérance du 5-FC

c) Injections intramusculaires répétées de TG6002

La seconde partie de l'étude est basée sur l'injection répétée de TG6002 chez 3 chiens beagles mâles sains. La dose à injecter est la dose maximale tolérée en injection unique évaluée précédemment : $5.0 \cdot 10^7$ PFU/kg (tableau 6). Trois injections de TG6002 par voie intramusculaire dans les quadriceps ou les muscles lombaires sont réalisées à une semaine d'intervalle. (J0, J7 et J14).

	Dose injectée PFU/kg	Volume injectée /kg	1ère injection		2ème injection		3ème injection	
			Dose (PFU)	volume	Dose (PFU)	Volume	Dose (PFU)	Volume
Chien 5	$5.0 \cdot 10^7$	138.88 µl	$4.25 \cdot 10^8$	1.18 mL	$4.35 \cdot 10^8$	1.21 mL	$4.45 \cdot 10^8$	1.24 mL
Chien 6	$5.0 \cdot 10^7$	138.88 µl	$5.0 \cdot 10^8$	1.39 mL	$5.05 \cdot 10^8$	1.40 mL	$5.20 \cdot 10^8$	1.44 mL
Chien 7	$5.0 \cdot 10^7$	138.88 µl	$5.7 \cdot 10^8$	1.58 mL	$5.65 \cdot 10^8$	1.57 mL	$5.70 \cdot 10^8$	1.58 mL

Tableau 9 : Volume de TG6002 injecté lors des injections répétées

Du 5-FC à la dose de 100mg/kg (tableau 7) est également donné 4 jours après les injections. Ce traitement est donné deux fois par jour (matin et soir) par voie orale pendant 3 jours. (J4 à J6, J11 à J13 et J18 à J20).

Poids des chiens	Comprimé de 100mg (matin et soir)	Comprimé de 500mg (Matin et soir)
8,50 à 9,49 kg	4	1
9,50 à 10,45 kg	0	2
10,50 à 11,49 kg	1	2
11,50 à 12,49 kg	2	2

Tableau 10 : Quantité de 5-FC donnée lors des traitements biquotidiens dépendante du poids des chiens.

Tout comme dans la première étude, des échantillons de fluides corporels sont collectés avant chaque injection, 24h et 48h après chaque injection puis une semaine et trois semaines après la dernière injection. (J0, J1, J2, J7, J8, J9, J14, J15, J16, J21 et J35).

Les chiens ont un examen clinique complet quotidien durant 25 premiers jours puis entre J26 et J35 les chiens sont observés quotidiennement (état général et appétit) mais les examens cliniques complets ne sont réalisés que 3 fois par semaine.

Des examens hématologiques et biochimiques sont réalisés avant la première injection puis 3 jours après chaque traitement au 5-FC et à la sortie de l'étude (J0, J9, J16, J23 et J35).

Pour chaque chien, une quantité de 5 mL de sang est prélevée et répartie équitablement entre un tube sec et un tube EDTA au début et à la fin de l'étude (J0 et J35).

A J9, J16 et J23, une quantité de 2,5 mL de sang sur tube EDTA est prélevée. Les tubes sont transférés en mains propres au laboratoire Biovelys le jour même à 4°C.

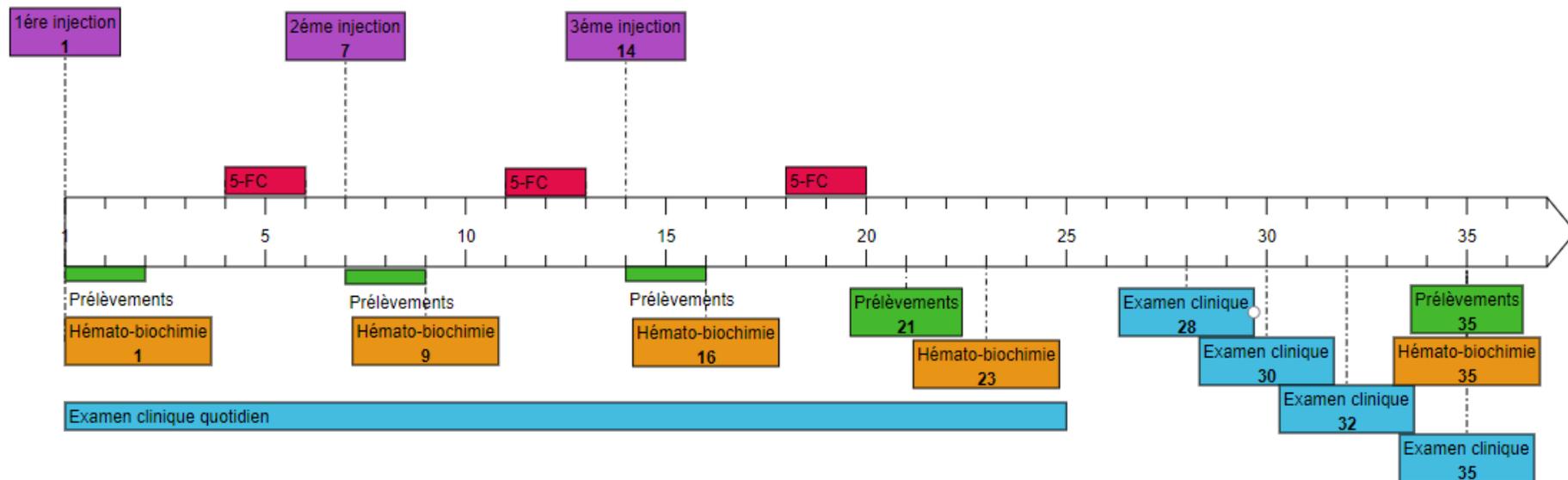


Figure 27 : Protocole d'étude de tolérance du TG6002 en injections répétées.

C. Critère d'évaluation de la tolérance

La tolérance est définie par le dictionnaire pharmaceutique comme la capacité de l'organisme à supporter sans effet gênant l'administration de substances chimiques, dont des médicaments. L'étude de tolérance d'un médicament est nécessaire avant toute étude d'efficacité. Divers examens cliniques, biochimiques et hématologiques permettent de vérifier l'absence d'effet nocif du médicament sur l'organisme.

La toxicité est évaluée en se basant sur le Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1, 2016.

a) Examen clinique

L'examen clinique quotidien réalisé dans toutes les études est un examen complet incluant notamment, la température rectale, les lésions cutanées, l'appétit et l'état général. Les manipulateurs doivent changer de gants après s'être occupé de chaque animal. En cas d'apparition de pustule, le chien doit être isolé jusqu'à disparition de la réaction.

L'apparition de diarrhée, vomissement, dysorexie, réaction cutanée et neutropénie est également étroitement surveillée.

Un suivi du poids de chaque chien est également réalisé quotidiennement.

En cas de décès ou d'euthanasie d'un animal de l'étude, des examens d'anatomopathologie et Les analyses immunohistochimiques seront pratiqués de manière à investigué la présence ou non de virus et son éventuelle influence sur les lésions.

b) Numération formule sanguine

Dans l'étude de tolérance du TG6002, une numération formule sanguine est effectuée au début et à la fin des deux études. Ce bilan est également réalisé 3 jours après chaque traitement au 5-FC dans le cas de l'injection à dose répétée.

Pour l'étude de tolérance du 5-FC, elle est réalisée au début de l'étude puis toutes les semaines jusqu'à la fin de l'étude.

Dans les deux études, la numération formule sanguine est complète.

Elle comprend

- la quantification des :
 - Hématies
 - Réticulocytes,
 - Plaquettes,
 - Leucocytes,
 - Neutrophiles non segmenté,
 - Neutrophile,
 - Eosinophiles,
 - Basophiles,
 - lymphocytes,
 - Monocytes,

- L'évaluation de :
 - La Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCHC),
 - la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (MCH)
 - le Volume Globulaire Moyen (MCV),
 - l'hématocrite
 - le taux d'hémoglobine.

c) Paramètres biochimiques

Dans l'étude de tolérance du TG6002, un bilan biochimique 6 paramètres est réalisé au début, à la fin de l'étude et 3 semaines après la fin des injections répétées.

Pour l'étude de tolérance du 5-FC, il est réalisé au début de l'étude puis toutes les semaines jusqu'à la fin de l'étude.

Ce bilan permet notamment la surveillance du foie et des reins.

Il comprend la mesure des concentrations plasmatiques de :

- l'albumine,
- les protéines totales,
- les Alanine aminotransférase (ALAT),
- les phosphatases alcalines (PAL),
- l'urée
- la créatinine.
- le calcium ionisé (étude tolérance du TG6002 uniquement),
- le glucose (étude tolérance du TG6002 uniquement),

d) Lésions cutanées

Lors de l'étude de tolérance du 5-FC, en cas d'effets secondaires cutanés, une biopsie réalisée au biopsie Punch (3mm) sous anesthésie générale (midazolam et médétomidine ; analgésie locale (lidocaïne) et systémique (buprénorphine) sera réalisée afin de permettre une analyse histologique des lésions.

D. Evaluation de l'excrétion virale

Des échantillons de fluides corporels sont collectés avant, 24h et 48h après chaque injection de TG6002.

Lors de chaque prélèvement :

- 5mL de sang sont prélevés sur un tube EDTA conservé à -80°C jusqu'à l'envoi au laboratoire
- Un écouvillonnage buccal est réalisé à l'aide du kit « Universal viral Transport Standard kit » puis conservé à -80°C jusqu'à l'envoi au laboratoire
- Une ponction vésicale échoguidée et réalisée. 5mL d'urine sont relevées et stockées dans un tube en polypropylène stérile type Flacon® de 15mL puis conservées à -80°C jusqu'à l'envoi au laboratoire.
- Un prélèvement d'au minimum 1g de selle dans un tube en polypropylène stérile type Flacon® de 45mL ou 15mL est réalisé puis conservé à -80°C jusqu'à l'envoi au laboratoire.

Une fois ces prélèvements collectés, ils sont congelés à -80°C puis envoyés au laboratoire de recherche de transgène.

La présence de virus résiduels dans les fluides corporels est évaluée de deux manières :

- Un titrage viral est réalisé dans les échantillons de sang, urine et salive par un dosage du titre infectieux sur cellules CEF (Chicken Embryo Fibroblast). Ce titrage permet d'évaluer l'activité virale présente dans les fluides corporels des chiens traités.
- Une qPCR est effectuée sur les échantillons de sang, urine, salive et fèces permet de quantifier le nombre de copies du génome viral.

De manière à estimer au mieux l'excrétion virale, un titrage en virus est couplé à une qPCR.

Le titrage des virus est réalisé par la quantification des plages de lyse. Les fluides corporels à analyser sont dilués en série puis administrés à des cultures cellulaires. Après un temps d'incubation, l'observation des cellules lysées par le virus, sous forme de plage de lyse, dans les différentes concentrations de l'échantillon permet d'estimer la quantité de virus initialement présent.

Il faut cependant faire attention aux contaminations par les fèces ou débris cellulaires. En effet, les contaminations par divers déchets peuvent entraîner la mort des cultures cellulaires et donc empêcher le titrage viral.

La qPCR ou PCR quantitative est une réaction de polymérase en chaîne permettant d'estimer la quantité d'ADN présents dans un échantillon grâce à des sondes fluorescentes et des amorces correspondants à une séquence précise d'ADN.

Cette technique ne permet cependant la mise en évidence du génome viral. Le reste des composants viraux (protéines, capside,...) n'est pas mis en évidence.

La qPCR ne permet pas d'affirmer l'absence de génome viral mais de montrer que le génome est en quantité inférieure au seuil de détection.

Le fait de réaliser ces deux techniques permet donc de doser à la fois les virus cytolytiques et l'ADN viral. Ce qui permet d'assurer une excrétion virale très faible.

E. Evaluation de la concentration sérique en 5-FC

Lors de l'étude de tolérance du 5-FC, la concentration sérique en 5-FC et 5-FU est évaluée par prise de sang à la veine jugulaire (1 mL) à J0, J7, J14 et J21 au temps T0, T0+15min, T0+30min, T0+45min, T0+60 min, T0+90 min, T0+120 min, T0+4h, T0+6h, T0+8h, T0+12h.

Les dosages seront réalisés par chromatographie en phase liquide à haute performance. Les échantillons seront conservés à -80°C avant analyse.

IV) Résultats

a) Injection du TG6002 en dose unique

- Examens cliniques

Lors de l'injection en dose simple, aucune variation significative de température rectale (Annexe 1) ou anomalie lors des examens cliniques n'est relevée. Aucune lésion cutanée au niveau du site d'injection n'est mise en évidence.

Une baisse de poids corporel est observée pour les 4 chiens (Annexe 2) :

- Chien 1 : 2.54%
- Chien 2 : 8.6%
- Chien 3 : 4.1%
- Chien 4 : 8%

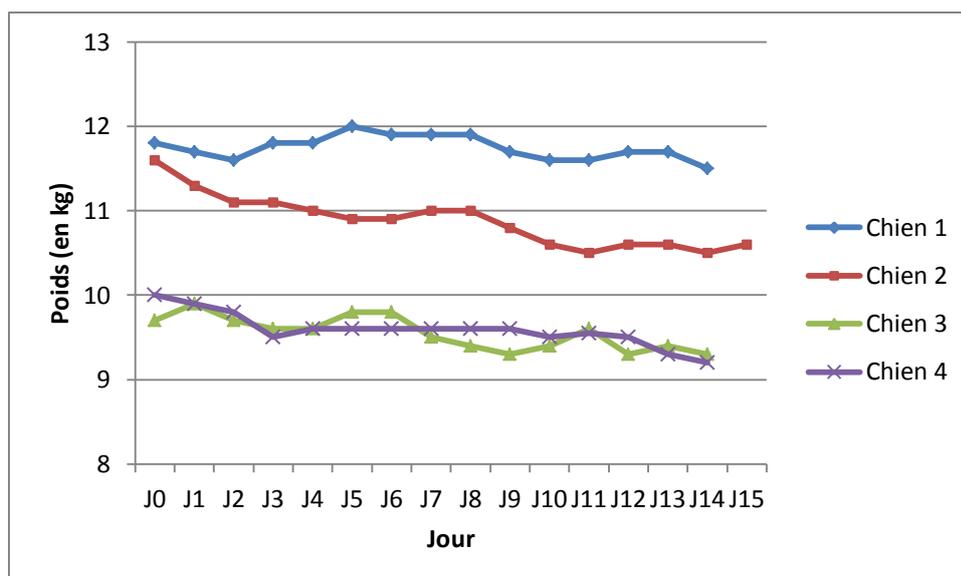


Figure 28 : Variation de poids de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002

Cette perte de poids de moins de 10% du poids initial correspond à un effet secondaire de grade 1 d'après le Veterinary cooperative oncology group (2011).

- Examen biochimique

L'urée, la créatinine, l'albumine, les ALAT, les PAL, la glycémie et la calcémie ionisée sont dans les normes avant et après le traitement. (Annexe 3)

Les protéines totales sont légèrement en dessous de la norme après traitement chez le chien 3. Aucune signification clinique n'est cependant observée.

- Examen hématologique

Les examens hématologiques montrent les valeurs dans les normes. (Annexe 4)

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine est légèrement en dessous des normes du laboratoire pour l'ensemble des chiens avant et après le traitement. Cependant, aucune anomalie clinique ou biologique en corrélation n'est remarquée.

De même, le nombre de lymphocytes est légèrement augmenté par rapport à la norme du laboratoire chez le chien 1 avant et après le traitement et le chien 2 après le traitement. Mais aucune conséquence clinique n'est remarquée.

En conclusion, aucun effet secondaire clinique, hématologique ou biochimique majeur n'est observé. Le seul effet secondaire notifié est une perte de poids de grade 1 sur l'ensemble des chiens de l'étude. C'est pourquoi la dose la plus haute injectée ($5.0 \cdot 10^7$ PFU/kg), est choisie pour réaliser les injections répétées.

- Excrétion virale

Concernant l'excrétion virale, aucun virus et aucune activité virale n'ont été retrouvés dans les fèces ou les fluides corporels lors des prélèvements, 24h et 48h après l'injection. (Annexe 5)

La première phase de l'étude de tolérance ne met pas en évidence d'effets secondaires majeurs ni d'excrétion virale suite à l'injection de TG6002 à des doses allant de $1 \cdot 10^6$ PFU/kg à $5 \cdot 10^7$ PFU/kg. La dose maximale tolérée de TG6002 en injection unique est donc supérieure à $5 \cdot 10^7$ PFU/kg.

b) Administration répétée du 5-FC

- Examens cliniques

Les examens cliniques quotidiens ont révélé pour seule anomalie les lésions cutanées que nous développerons par la suite. Une baisse d'appétit a été constatée chez le chien 2 mais celle-ci coïncide avec le développement des lésions cutanées. L'hypothèse d'une douleur entraînant une baisse d'appétit est donc privilégiée. Le poids des chiens est resté stable durant l'étude à l'exception d'une perte de poids de 8% pour le chien 2 suite à la diminution de l'appétit. (Annexe 12)

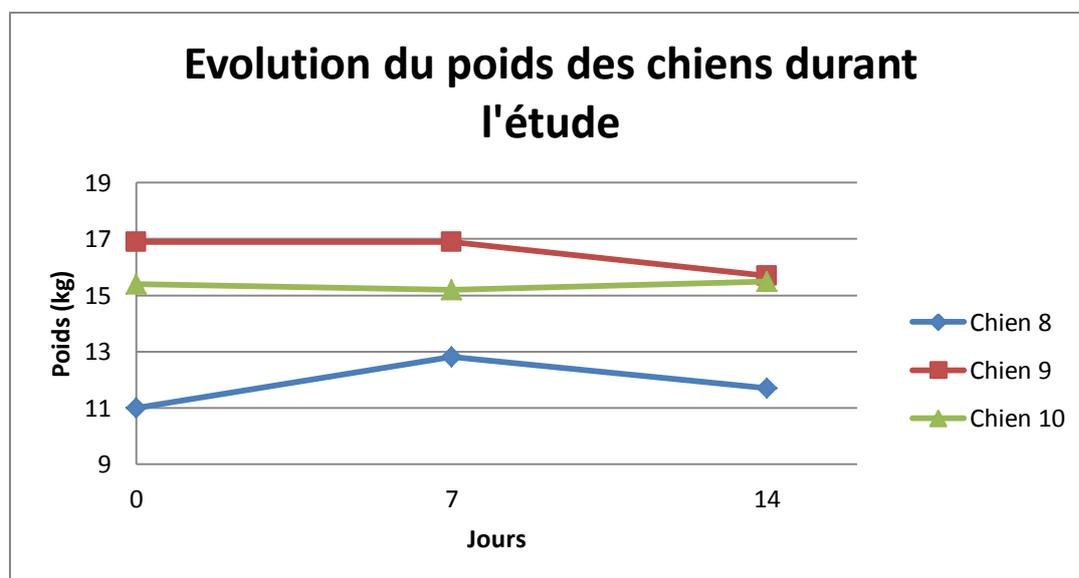


Figure 29: Evolution du poids des chiens lors de l'étude de tolérance du 5-FC

- Examens biochimiques et hématologiques

Les examens biochimiques et hématologiques n'ont pas révélé d'anomalie durant l'étude. (Annexe 13 et 14)

- Lésions cutanées

Des lésions cutanées sont apparues entre le 10ème et le 13ème jour après le début du traitement. Ces lésions sont localisées au niveau des babines, des narines, du pourtour des yeux, du philtrum ainsi que du scrotum chez le mâle.

	Poids (kg)	Dose (deux fois par jour)	Effets secondaires	Arrêt du traitement	Biopsie	Zones	Dose cumulée / poids (g/kg)	Dose cumulée (g)
Chien 8	11 kg	1100mg	J13	J13	J14	Babine, Narine, Pourtour de l'œil, Philtrum + scrotum	2.6	28.6
Chien 9	16,9kg	1700 mg	J10	J12	J15		2.01	34.0
Chien 10	15,4kg	1500 mg	J13	J13	J15		2.53	39.0

Tableau 11: Date d'apparition des lésions cutanées lors d'administration répétée de 5-FC

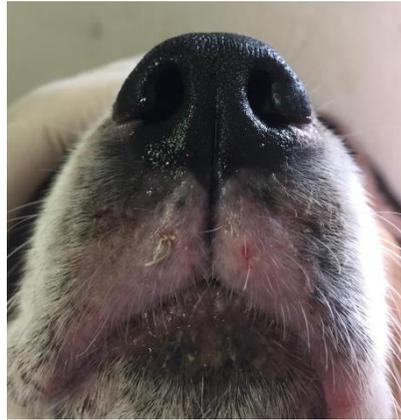
Les lésions sont tout d'abord ulcéraives et crouteuses au niveau des babines. Elles sont suivies d'une dépigmentation des narines et du philtrum nasal puis de croutes sur le pourtour des yeux (figure 31, 32 et 33)



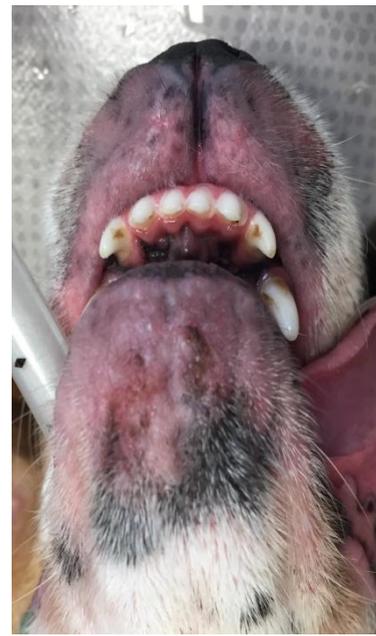
J0



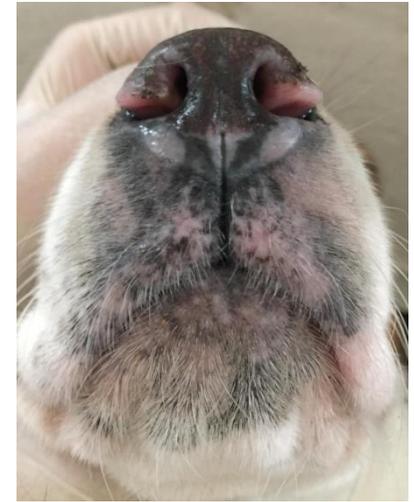
J14



J21



J24



J29

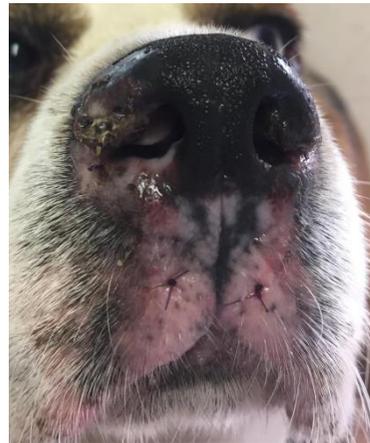
Figure 30: Evolution des lésions cutanées faciales du chien 8



J14



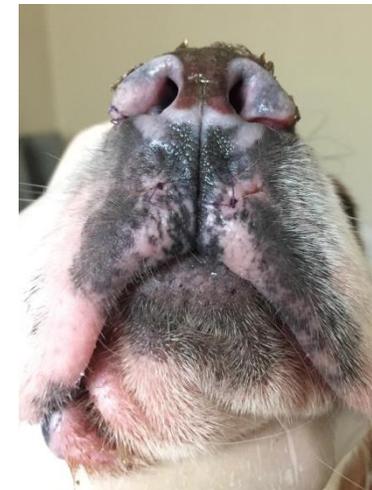
J17



J24

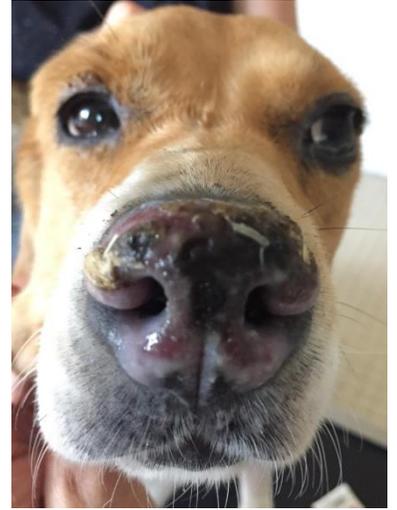


J25



J29

Figure 31 : Evolution des lésions cutanées faciales du chien 9



J0

J14

J21

J25

J29

Figure

32

:

Evolution

des

lésions

cutanées

faciales

du

chien

10

L'arrêt de la 5-FC est décidé dès l'apparition d'ulcération mineure, un traitement symptomatique est également mis en place. Les lésions faciales continuent à progresser durant 10 jours après l'arrêt de la 5-FC puis s'améliorent spontanément jusqu'à régression complète. Les lésions cutanées localisées au niveau des mamelles sont les plus longues à rétrocéder. Elles guérissent un mois et demi après l'arrêt de l'administration du 5-FC. (Annexe 15)

Des biopsies cutanées des lésions de effectuées à J14 pour le chien 1 et J15 pour les chiens 2 et 3 (soit 1 à 3 jours après l'apparition d'ulcération et de l'arrêt du traitement) mettent en évidence une dermatite d'interface compatible en première hypothèse avec des lésions de nécrose épidermique toxique.

- Pharmacocinétique

Tout d'abord, lors de l'administration de 5-FC sans TG6002, aucune trace de 5-FU n'a été trouvée lors des titrages sanguins. Ce résultat est cohérent avec l'absence de gène *FCU1* chez les chiens.

Concernant la pharmacologie du 5-FC, le maximum de la concentration sérique est observé 1h30 à 2h après l'ingestion de la gélule. La concentration sérique en 5-FC augmente des 15 minutes après l'ingestion et le 5-FC reste présent dans le sang plus de 12h (figure 45 et 46).

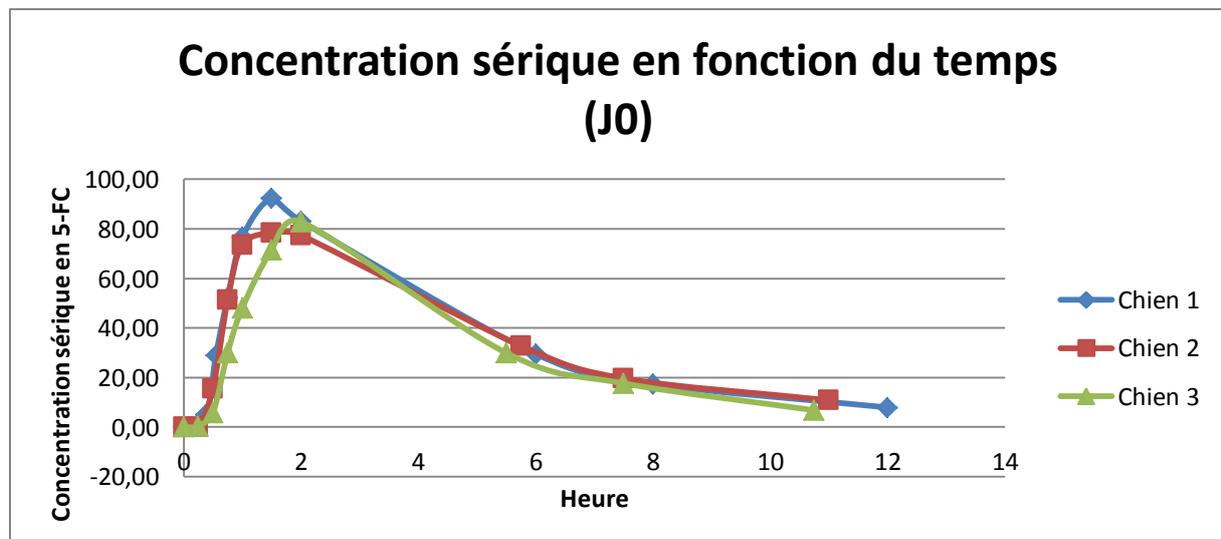


Figure 33 : Evolution de la concentration sérique en 5-FC dans les 12h suivant la première administration

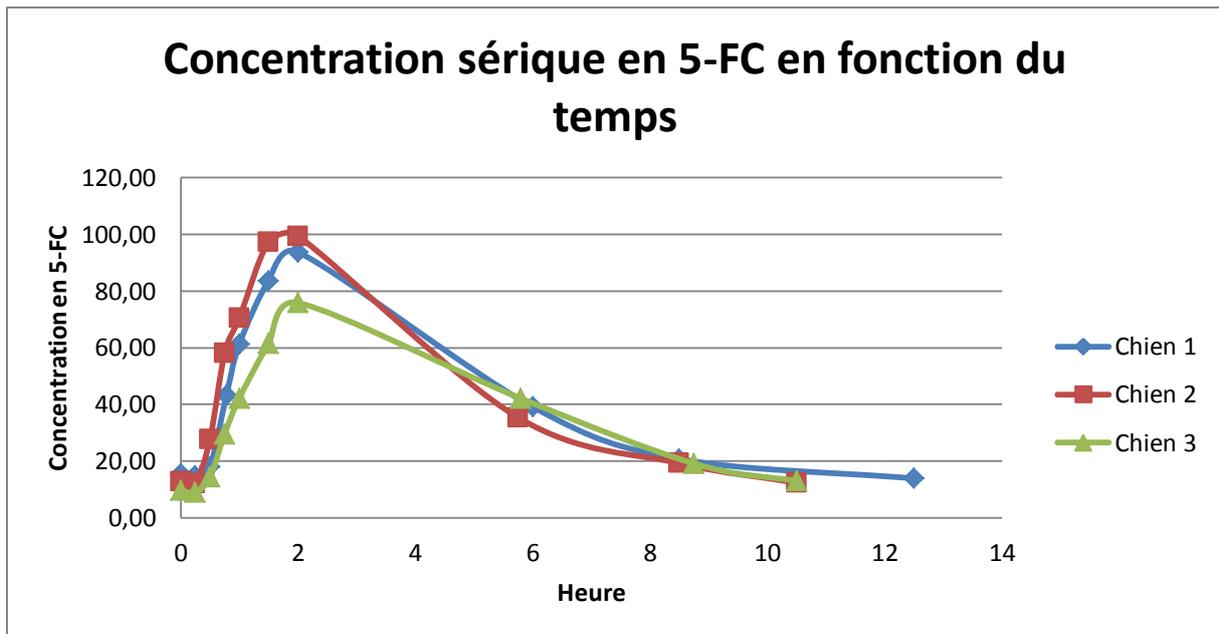


Figure 34 : Evolution de la concentration sérique lors des 12h suivant une prise

Ces données nous permettent de calculer la demi vie de la 5-FC, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que, après l'administration, la concentration plasmatique en 5-FC diminue de moitié. D'après les graphiques, la demi-vie de la 5-FC est donc comprise entre 2 et 4h.

Le temps d'élimination du 5-FC par l'organisme semble être variable : à J21, soit 9 jours après la dernière administration, le titrage sanguin met en évidence 11,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 5-FC chez le chien 1, 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chez le chien 2 et 6,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chez le chien 3.

En conclusion, cette étude montre des effets secondaires cutanés (dépigmentation, croutes, érythèmes, ulcérations) lors d'administration de 5-FC par voie orale à la dose de 200 mg/kg pendant plus de 10 jours consécutifs. Elle révèle également, une absence de toxicité biochimique, hématologique et clinique (autre que cutanée).

De plus, cette étude permet d'estimer le moment de la concentration sérique maximale à 1h30 à 2h après l'ingestion de la gélule et la demi-vie de la 5-FC administrée par voie orale entre 2 à 4h.

c) Injection du TG6002 en doses répétées

- Examen clinique

Lors de l'injection à doses répétées, le chien 7 a présenté une baisse d'état général se résolvant par un traitement symptomatique.

Le 15ème jour, lendemain de la 3ème injection, le chien 3 présente du méléna.

Le 16ème jour, le chien 7 est en hypothermie (37,6°C), abattu, anorexique, fortement déshydraté et amaigri (baisse de 14,6% de son poids en 24h).

Le 17ème jour, le chien 7 présente une amélioration de son état général. Il est de nouveau normotherme. Il présente cependant des vomissements et de la diarrhée (sans méléna). Il lui est impossible de s'alimenter car toute prise alimentaire déclenche des vomissements. Les examens biochimiques montrent une augmentation légère de l'urée (7,8 mmol/L à J0 et 12,7 mmol/L à J17 (grade 2)) (VU : 3,3 -10 mmol/L) sans augmentation de la créatinine (51,00 µmol/L; VU: 36 to 106 µmol/L)

Un traitement à base d'ULCAR® (sucralfate) 1 sachet matin et soir et de d'AZANTAC® (ranitidine) 1mL matin et soir soit 3mg/kg par voie intraveineuse est donné.

Le 18ème jour, du KAOPECTATE® (Kaolin et pectine) 15 mL/jour soit 2 mL/kg est donné avant le repas. Ce traitement est donné quotidiennement jusqu'au 21ème jour.

Le 26ème jour, l'alimentation physiologique du chien 3 est changée pour une alimentation hypoprotéique et hypophosphorylée (Hill's K/D, 1 boîte par jour). Une antibiothérapie à base de XEDEN 50® (enrofloxacin) un comprimé par jour (soit 6,67 mg/kg per os) est également mis en place.

Le 30ème jour, une résolution complète des signes cliniques est constatée. Une prise de poids est également notée jusqu'à J35.

Le 35ème jour, le chien 7 est euthanasié de manière à étudier réaliser des études immunohistochimiques et anatomopathologique. En effet, ces analyses sont nécessaires pour vérifier l'absence d'influence du virus sur les troubles digestifs présentés par le chien 3.

Les analyses immunohistochimiques permettent de mettre en évidence une absence de virus dans les organes digestifs ainsi que dans les reins.

Les signes cliniques présentés par le chien 7 sont évocateurs d'une gastro-entérite (troubles digestifs, anorexie, déshydratation, amaigrissement).

Les chiens 5 et 6 ne présentent pas de variation significative ou d'anomalie de leur température rectale (Annexe 6). Aucune anomalie lors de l'examen clinique n'est mise en

évidence. Les chiens ne présentent pas de lésions cutanées au niveau du site d'injection du virus.

Une baisse de poids corporel est observée pour les 3 chiens (Annexe 7) :

- Chien 5 : 7,1%
- Chien 6 : 3,0 %
- Chien 7 : 6,6%

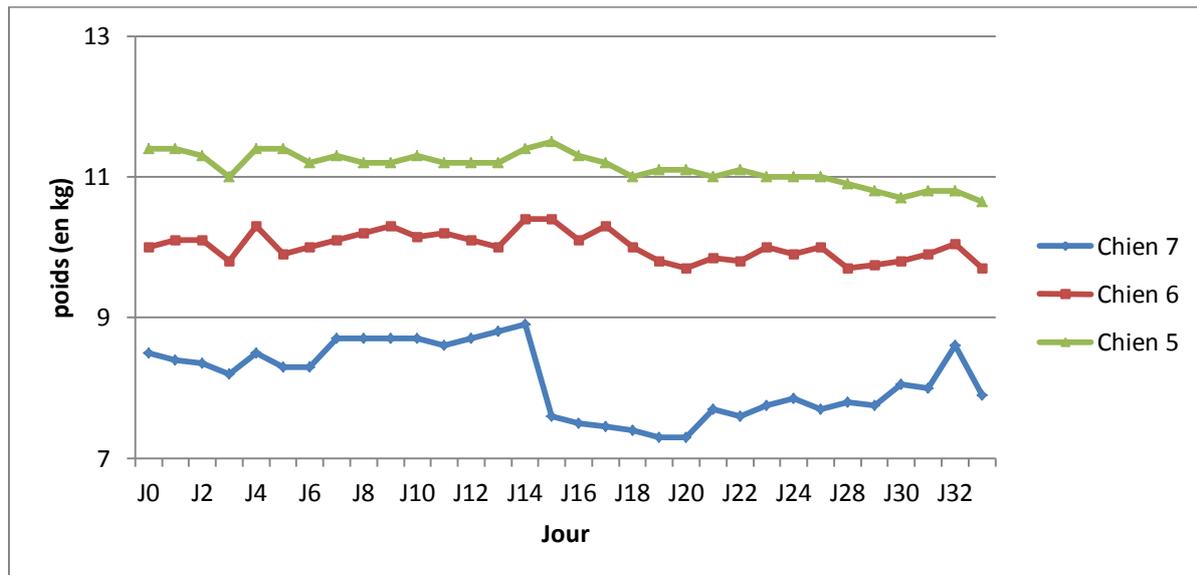


Figure 35 : Variation de poids de l'ensemble des chiens lors des injections répétées de TG6002

Cette perte de poids de moins de 10% du poids initial correspond à un effet secondaire de grade 1 d'après le Veterinary cooperative oncology group (2011).

- Examen biochimique

L'urée, la créatinine, l'albumine, les ALAT, les PAL, la glycémie et la calcémie ionisée sont dans les valeurs usuelles avant et après le traitement. (Annexe 8).

- Examen hématologique

Les examens hématologiques montrent des valeurs dans les valeurs usuelles. (Annexe 9)

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine est légèrement en dessous des normes du laboratoire pour l'ensemble des chiens durant toute la durée de l'étude.

Le nombre de lymphocytes a légèrement augmenté par rapport aux valeurs usuelles de l'analyseur chez le chien 8 et 9 en fin de traitement.

- Examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique du foie et du rein du chien 3, réalisée lors de l'autopsie conclut à :

- Une hépatopathie vacuolaire généralisée sévère et une hépatite nécrosante multifocale légère (nécrose unicellulaire à oligocellulaire).
- Une altération rénale avec présence de pigments intraépithéliaux (compatible avec des pigments biliaires ou de l'hémossidérine) dans les tubules contournés proximaux associée à une tubulopathie dégénérative légère.

Ces résultats sont compatibles avec une gastro-entérite ainsi qu'avec la toxicité digestive de la 5-FC rapportée dans la bibliographie.

- Excrétion virale

Concernant l'excrétion virale, aucun virus et aucune activité virale n'ont été retrouvés dans les fèces ou les fluides corporels lors des prélèvements, 24 et 48 h après chaque injection. (Annexe 10)

En conclusion, lors de cette seconde phase d'étude, un des 3 chiens ayant reçu des injections répétées de TG6002 a présenté des signes cliniques compatibles avec une gastro-entérite.

De plus, l'ensemble des chiens ont présenté, comme dans la première phase de l'essai, une perte poids de moins de 10% sans répercussion clinique ce qui correspond à un effet secondaire de grade 1. Ainsi que des protéines totales en dessous des valeurs usuelles et une lymphocytose.

V) Discussion

A. Effets secondaires constatés au cours des études

a) Troubles digestifs lors d'injections répétées de TG6002

Comme expliqué précédemment, au cours de la phase d'injections répétées, un des 3 chiens traités a présenté une baisse d'état général (anorexie, amaigrissement, déshydratation, trouble digestif) se résolvant complètement avec les traitements mis en place. L'autopsie ne montre pas de lésions particulières et l'immunohistochimie ne révèle par de TG6002 dans les organes digestifs et les reins.

L'injection répétée de TG6002 n'est donc probablement pas la cause des troubles digestifs. En effet, un traitement à base de 5-FC est également donné lors de cette étude. Comme évoqué dans la partie I, le 5-FC peut entraîner des troubles digestifs et notamment des diarrhées par malabsorption. Les bactéries contenues dans le tube digestif peuvent produire de la cytosine déamination entraînant une transformation du 5-FC en 5-FU. Le 5-FC, cytotoxique entraîne la mort des entérocytes. L'administration de 5-FC peut donc être en cause des troubles digestifs observés. (T. Aparicio and al. 2002)

Cependant, lors de l'étude de tolérance du 5-FC à 200 mg/kg/j soit 4 fois plus que lors de l'administration conjointe au TG6002 (100mg/kg trois jours par semaine), aucun trouble digestif n'a été mis en évidence.

Il est donc possible qu'une gastro-entérite infectieuse ait atteint le chien durant l'étude. Le traitement au 5-FC pouvant être un facteur aggravant de cette gastro-entérite expliquant l'absence de réponse au traitement symptomatique et la dégradation rapide de l'état général.

La baisse d'état général et les troubles digestifs du chien peuvent donc probablement être reliés à une gastro-entérite potentiellement aggravée par l'administration de 5-FC.

Il faudra cependant, dans la suite des études cliniques porter une attention particulière aux troubles digestifs.

b) Les lésions cutanées lors d'administration répétée de 5-FC

Les biopsies cutanées mettent en évidence des lésions de dermatite d'interface.

L'établissement du diagnostic différentiel des lésions de dermatite d'interface (tableau 12), nous permet de penser que les lésions observées sont causées par l'administration de 5-FC.

	Élément en faveur	Éléments en défaveur
Pemphigus érythémateux	Présence de croûtes et de squamosis. Atteinte de la truffe et des organes génitaux	Présence systématique de pustules. Atteinte des membres et notamment des coussinets. Ne rétrocede pas sans traitement immunosuppresseur.
Dermatomyosite	Lésions au niveau des lèvres et du pourtour des yeux	Maladie rare atteignant les colleys et shetlands de 2 à 6 mois. Atteinte des griffes et de la queue.
Lupus discoïde ou cutanéomuqueux	Atteinte de la face et notamment de la truffe. Erythème, érosion, dépigmentation	Photosensibilisation, hyperkératose des lésions. Perte des dermatoglyphes de la truffe. Ne rétrocede pas sans traitement immunosuppresseur. Histopathologie pathognomonique (dermatite d'interface avec infiltrat lichénoïde lympho-plasmocytaire et épaissement de la membrane basale).
Leishmaniose	Lésions possiblement localisées au niveau de la truffe, présence de croûte.	Pas de voyage dans une « zone à risque. Pas de trouble systémique. Ne rétrocede pas sans traitement spécifique.
Administration de 5-FC	Lésions croûtes et ulcératives au niveau de la truffes, du pourtour des yeux, des organes génitaux. Rétrocedant à l'arrêt du 5-FC. Absence de trouble systémique.	

Tableau 12 : Diagnostic différentiel des dermatites d'interface

L'apparition des lésions suite à l'administration du 5-FC, les lésions cutanées rapportées dans la bibliographie ainsi que l'exclusion des autres causes de dermatite d'interface nous permet donc de relier les lésions cutanées des chiens à l'administration de 5-FC.

Les lésions cutanées sont apparues chez tous les animaux de l'étude lorsque la dose cumulée de 5-FC est entre 2 et 2,6 g/kg après 10 à 13 jours de traitement.

Ces résultats sont comparables avec la bibliographie. (R. Malik and al. 1996)

Les lésions cutanées observées dans cette étude sont également situées sur la face et au niveau des appareils génitaux. Les lésions cutanées se manifestaient également par des

croutes, des ulcérations et des dépigmentations rétrocedant suite à l'arrêt du traitement et se résolvant totalement dans les 2 semaines à 2 mois suivant l'arrêt du traitement.

Dans l'étude de R. Malik et son équipe, la dose de 5-FC quotidienne était plus basse (150 mg/kg/j) que dans notre étude (200 mg/kg/j), les lésions se sont manifestées après 20 jours de traitements soit une dose cumulée de 3 g/kg de 5-FC.

Lors d'administration de 5-FC, il faudrait donc éviter d'atteindre cette dose cumulée, ainsi que de donner quotidiennement 200 mg/kg de 5-FC pendant plus de 9 jours.

Des alternatives pour diminuer les risques de lésions cutanées doivent être recherchées. Ainsi on peut imaginer :

- Un traitement de moins de 10 jours
- Une seule prise quotidienne de 100 mg/kg par jour
- Deux prises quotidiennes de 75 mg/kg/jour
- Un traitement par cure : une semaine de traitement puis une « pause » puis reprendre le traitement si besoin.

B. Limites du modèle choisi

a) Effets secondaires

L'étude de tolérance réalisée ici, a lieu sur des Beagles en bonne santé. Comme expliqué précédemment, la virothérapie oncolytique est une thérapie ciblée. En effet, le virus est génétiquement modifié pour ne se répliquer que dans les cellules tumorales.

On peut donc penser que chez les individus sains, l'absence de tumeur ne permet pas la réplication normale du TG6002. Or si le TG6002 ne se réplique par normalement, il paraît légitime de se dire que les effets secondaires et l'excrétion virale seront moins présents voir absents.

Cette étude ne permet donc pas d'exclure totalement la présence d'effets secondaires lors d'injection de TG6002 à des chiens présentant des tumeurs. Une prochaine étude sur des chiens atteints de cancer est donc nécessaire pour juger de l'efficacité mais aussi de l'innocuité du TG6002.

b) Nombre d'animaux

Les études ont été réalisées sur 3 à 4 chiens beagles. L'utilisation d'un petit nombre de chien ainsi que de chien de même race sont un facteur limitant pour l'étude de tolérance. En effet, pour s'assurer d'une entière sécurité du TG6002 et du 5-FC une étude sur un panel plus

grand serait nécessaire, les considérations éthiques ne le permettent cependant pas c'est pourquoi une prochaine étude sur des chien atteints de cancer est nécessaire.

c) Excrétion virale

L'évaluation de l'excrétion virale est limitée par les éventuelles contaminations par les fèces ou débris cellulaires. En effet, les contaminations par divers déchets peuvent entraîner la mort des cultures cellulaires et donc empêcher le titrage viral.

C. Etude pharmacocinétique du 5-FC

Le calcul de la demi-vie de la 5-FC est ici réalisé sur une administration *per-os* du médicament sur 3 animaux.

Les études de pharmacocinétique nécessitent des injections intraveineuses en plus des administrations orales ainsi qu'une cohorte de plus de 3 animaux pour pouvoir déterminer précisément la demi-vie d'un médicament.

Cette étude nous permet donc d'avoir uniquement un ordre d'idée de l'absorption, la demi-vie et l'élimination de la 5-FC lors d'administration *per os* sans être réellement une étude précise de la pharmacocinétique. Ainsi, la voie d'élimination, la distribution, les interactions, *etc* ne sont pas étudiées.

De même, le calcul de la biodisponibilité de la 5-FC administrée par voie orale ne peut être effectué sans avoir la courbe de référence de l'administration par voie intraveineuse.

D'après le résumé des caractéristiques du produit (RCP) de l'Ancotil®, la 5-FC est résorbée à 90% par le tractus digestif et la demi-vie plasmatique est de 3 à 6 heures. (ANSM, 2009). Nos résultats sont donc en adéquation avec les références.

Conclusion

La virothérapie oncolytique fait partie des nouveaux traitements contre le cancer. Ce moyen de lutter permet de répondre à la nécessité de thérapies ciblées, permettant d'avoir un espoir dans la prise en charge des tumeurs chimiorésistantes, radiorésistantes et non opérables.

En 2005, le premier virus oncolytique, ONCORIN® se commercialise en Chine en combinaison avec la chimiothérapie. Depuis 2015, l'IMLYGIC® détient une AMM en Europe, aux états Unis et en Australie. De nombreux autres virus tels que le virus de la vaccine sont au stade d'essais cliniques et s'annoncent prometteurs.

Ce travail permet de dresser une synthèse sur les mécanismes d'actions des différents virus oncolytiques, leurs enjeux et leur efficacité.

Les différents exemples nous ont permis de voir les limites du modèle murin et l'importance du modèle canin lors de la réalisation des essais cliniques. Le modèle canin permet, en effet, l'évaluation de l'innocuité, l'efficacité et la toxicité sur des tumeurs spontanées et des animaux possédant un système immunitaire comparable à celui de l'humain.

La partie expérimentale nous a permis d'étudier l'innocuité et l'excrétion d'un virus oncolytique dérivé de la vaccine armée d'un gène thérapeutique, le TG6002, associé au 5-FC. Ainsi que la tolérance de l'administration quotidienne de 5-flucytosine. Les résultats obtenus lors de l'injection intramusculaire de TG6002 (couplée ou non à l'administration de 5-FC) chez des chiens sains sont encourageants.

Ainsi, l'étude de tolérance montre l'innocuité de l'injection intra musculaire de TG6002 couplée à l'administration de 5-FC a 100mg/kg/j chez des chiens sains. La dose maximale tolérée est $5 \cdot 10^7$ PFU/kg. Cette étude montre également l'absence d'excrétion virale lors d'injection intramusculaire unique ou d'injections répétées. La prochaine étape est l'étude de l'efficacité du TG6002 lors d'injection intratumorale puis intraveineuse chez des chiens atteints de tumeurs spontanées.

Bibliographie

- ALTOMONTE J., MAROZIN S., SCHMID R.M., EBERT O. (2010) Engineered newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma. *Mol. Ther.* 18(2), 275-284
- ANSM (2009) Résumé des Caractéristiques du Produit de l'Ancotil 500mg. [<http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0207900.htm>] (consulté le 27/03/2020).
- APARICIO T., DUCREUX M., CHAUSSADE S. (2008) 5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 26(1), 38-47
- AUTIO K., KNUUTTILA A., KIPAR A., *et al.* (2016) Anti-tumour activity of oncolytic Western Reserve vaccinia viruses in canine tumour cell lines, xenografts, and fresh tumour biopsies. *Vet Comp Oncol* 14(4), 395-408
- BENSIGNOR E. (2003a) Le lupus discoïde canin : comparaison avec le lupus discoïde chez l'homme. *Bul. de l'Ac. Vét. de France* 157(2), 35-39
- BENSIGNOR E. (2003b) Le lupus discoïde canin : comparaison avec le lupus discoïde chez l'homme. *Bul. de l'Ac. Vét. de France* n°1, 35
- BRENNAN T. (2017) Etude translationnelle des propriétés oncolytique des vecteurs dérivés des virus de la vaccine. Thèse Med. Vet.
- BULLER R.M., CHAKRABARTI S., COOPER J.A., TWARDZIK D.R., MOSS B. (1988) Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* 62(3), 866-874
- BURKE J. (2010) Virus therapy for bladder cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(2-3), 99-102
- CHRISTOPHIDIS N., VAJDA F.J., LUCAS I., *et al.* (1978) Fluorouracil therapy in patients with carcinoma of the large bowel: a pharmacokinetic comparison of various rates and routes of administration. *Clin Pharmacokinet* 3(4), 330-336
- COFFEY M.C., STRONG J.E., FORSYTH P.A., LEE P.W. (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282(5392), 1332-1334
- COLLOT-TEIXEIRA S. (2003) Implication de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) dans la lymphomogénèse du lymphome de Hodgkin : rôle de l'oncogène viral DR7. Thèse Bio. Scien. Santé. Université de limoge
- DE GRAMONT A., BOSSET J.F., MILAN C., *et al.* (1997) Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J. Clin. Oncol.* 15(2), 808-815

- DECOSTER A., LEMAHIEU J.-C., PEIGUE-LAFEUILLE H. (2005) Rhabdoviridae. *In Rhabdoviridae*. [<http://www.microbes-edu.org/etudiant/rhabdoviridae.html>] (consulté le 25/03/2019).
- DELEU L., DAEFFLER L., FAISST S., ROMMELAERE J. (2002) Action oncolytique des parvovirus de rongeurs. *Virologie* 6(1), 29-40
- DHAWAN D., HAHN N.M., RAMOS-VARA J.A., KNAPP D.W. (2018) Naturally-occurring canine invasive urothelial carcinoma harbors luminal and basal transcriptional subtypes found in human muscle invasive bladder cancer. *PLOS Genetics* 14(8), 1-15
- DODON M.D., BARBEAU B., MESNARD J.-M. (2010) Leucémies T induites par HTLV-1 - Y a-t-il un avant et un après HBZ ? *Med Sci (Paris)* 26(4), 391-396
- DRANOFF G. (2002) GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 188, 147-154
- ERBS P., FINDELI A., KINTZ J., *et al.* (2008) Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 15(1), 18-28
- ETIENNE M.C., LAGRANGE J.L., DASSONVILLE O., *et al.* (1994) Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 12(11), 2248-2253
- FEND L., REMY-ZILLER C., FOLOPPE J., *et al.* (2015) Oncolytic virotherapy with an armed vaccinia virus in an orthotopic model of renal carcinoma is associated with modification of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 5(2), 1-11
- FOILLARD S. (2008) Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie tumorale. Thèse Bioch. Phy. UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
- FOLOPPE J., KEMPF J., FUTIN N., *et al.* (2019) The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism. *Mol Ther Oncolytics* 14(14), 1-14
- FUKUHARA H., INO Y., TODO T. (2016) Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 107(10), 1373-1379
- GAMELIN E., BOISDRON-CELLE M., GUÉRIN-MEYER V., *et al.* (1999) Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J. Clin. Oncol.* 17(4), 1105
- GELETNEKY K., HAJDA J., ANGELOVA A.L., *et al.* (2017) Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Mol Ther* 25(12), 2620-2634

- GENTSCHEV I., PATIL S.S., ADELINGER M., *et al.* (2013) Characterization and evaluation of a new oncolytic vaccinia virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy. *Bioengineered* 4(2), 84-89
- GENTSCHEV I., PATIL S.S., PETROV I., *et al.* (2014) Oncolytic Virotherapy of Canine and Feline Cancer. *Viruses* 6(5), 2122-2137
- GOMELLA L.G., MASTRANGELO M.J., MCCUE P.A., *et al.* (2001a) Phase i study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. *J. Urol.* 166(4), 1291-1295
- GOMELLA L.G., MASTRANGELO M.J., MCCUE P.A., *et al.* (2001b) Phase i study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. *J. Urol.* 166(4), 1291-1295
- GORLICK R., KHANNA C. (2010) Osteosarcoma. *J. Bone Miner. Res.* 25(4), 683-691
- GUSE K., CERULLO V., HEMMINKI A. (2011) Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 11(5), 595-608
- HAKKARAINEN T., HEMMINKI A.E. (2005) Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes. *Gene ther. mol. biol.* 2005(9), 153-168
- HANAHAHAN D., WEINBERG R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70
- HANEL E.G., XIAO Z., WONG K.K., *et al.* (2004) A novel intravesical therapy for superficial bladder cancer in an orthotopic model: oncolytic reovirus therapy. *J. Urol.* 172(5 Pt 1), 2018-2022
- HARRISON M.S., SAKAGUCHI T., SCHMITT A.P. (2010) Paramyxovirus Assembly and Budding: Building Particles that Transmit Infections. *Int J Biochem Cell Biol* 42(9), 1416-1429
- HEINRICH B., KLEIN J., DELIC M., *et al.* (2017) Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes. *Onco Targets Ther* 10(10), 2389-2401
- HUBER B.E., AUSTIN E.A., GOOD S.S., *et al.* (1993) In Vivo Antitumor Activity of 5-Fluorocytosine on Human Colorectal Carcinoma Cells Genetically Modified to Express Cytosine Deaminase. *Cancer Res* 53(19), 4619-4626
- HUBER B.E., AUSTIN E.A., RICHARDS C.A., DAVIS S.T., GOOD S.S. (1994) Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17), 8302-8306
- HWANG C.C., IGASE M., SAKURAI M., *et al.* (2018) Oncolytic reovirus therapy: Pilot study in dogs with spontaneously occurring tumours. *Vet Comp Oncol* 16(2), 229-238

- JAS D., SOYER C., FORNEL-THIBAUD P.D., *et al.* (2014) Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials in Vaccinology* 4(4), 1-8
- JENKS N., MYERS R., GREINER S.M., *et al.* (2010) Safety Studies on Intrahepatic or Intratumoral Injection of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Interferon- β in Rodents and Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther* 21(4), 451-462
- JOURDIER T.-M., MOSTE C., BONNET M.-C., *et al.* (2003) Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther.* 10(26), 2126-2132
- KAKINOKI K., NAKAMOTO Y., KAGAYA T., *et al.* (2010) Prevention of intrahepatic metastasis of liver cancer by suicide gene therapy and chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J Gene Med* 12(12), 1002-1013
- KARAPETIS C.S., PATTERSON W.K., PITTMAN K.B., KOTASEK D., SAGE R.E. (1999) Treatment of metastatic breast cancer with continuous infusional 5 fluorouracil. *Aust N Z J Med* 29(4), 517-522
- KHANNA C., HUNTER K. (2005) Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26(3), 513-523
- KHURI F.R., NEMUNAITIS J., GANLY I., *et al.* (2000) A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 6(8), 879-885
- KIRN D.H., THORNE S.H. (2009) Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9(1), 64-71
- LAMONT J.P., NEMUNAITIS J., KUHN J.A., LANDERS S.A., MCCARTY T.M. (2000) A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann. Surg. Oncol.* 7(8), 588-592
- LEMAY G. (2002) Le réovirus de mammifères : un virus «orphelin» contre les cancers humains. *Med Sci (Paris)* 18(12), 1282-1286
- LIU T.-C., HWANG T., PARK B.-H., BELL J., KIRN D.H. (2008) The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol. Ther.* 16(9), 1637-1642
- LYONS M., ONION D., GREEN N.K., *et al.* (2006) Adenovirus Type 5 Interactions with Human Blood Cells May Compromise Systemic Delivery. *Molecular Therapy* 14(1), 118-128

- MALIK R., MEDEIROS C., WIGNEY D., LOVE D. (1996) Suspected drug eruption in seven dogs during administration of flucytosine. *Australian Veterinary Journal* 74(4), 285-288
- MENARD K., FLESNER B.K., GLAHN A., BOUDREAUX B., BRYAN J.N. (2018) Concurrent 5-fluorouracil and carboplatin for the treatment of canine carcinomas. *Vet Comp Oncol* 16(4), 590-595
- MENDOZA S., KONISHI T., DERNELL W.S., WITHROW S.J., MILLER C.W. (1998) Status of the p53, Rb and MDM2 genes in canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 18(6A), 4449-4453
- MERLO D.F., ROSSI L., PELLEGRINO C., *et al.* (2008) Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J. Vet. Intern. Med.* 22(4), 976-984
- Meta-Analysis Group In Cancer, LÉVY E., PIEDBOIS P., *et al.* (1998) Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J. Clin. Oncol.* 16(11), 3537-3541
- Meta-analysis Group In Cancer, PIEDBOIS P., ROUGIER P., *et al.* (1998) Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 16(1), 301-308
- MOERTEL C.G., FLEMING T.R., MACDONALD J.S., *et al.* (1990) Levamisole and Fluorouracil for Adjuvant Therapy of Resected Colon Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 322(6), 352-358
- MOTA H.C. (1973) Infantile Hodgkin's disease: remission after measles. *Br Med J* 2(5863), 421
- MURAD A.M., SANTIAGO F.F., PETROIANU A., *et al.* (1993) Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer* 72(1), 37-41
- NETTI P.A., BERK D.A., SWARTZ M.A., GRODZINSKY A.J., JAIN R.K. (2000) Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* 60(9), 2497-2503
- O'BRIEN D.J., KANEENE J.B., POPPENG R.H. (1993) The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. *Environ Health Perspect* 99(99), 351-368
- PALMER K.R., KERR M., KNOWLES G., *et al.* (1994) Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br J Surg* 81(6), 882-885
- PAOLONI M.C., KHANNA C. (2007) Comparative Oncology Today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37(6), 1023-1032

- PAOLONI M., KHANNA C. (2008) Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer* 8(2), 147-156
- PAPADEAS E., NAXAKIS S., RIGA M., KALOFONOS Ch. (2007) Prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis by oral cryotherapy: A randomized controlled study. *European Journal of Oncology Nursing* 11(1), 60-65
- PATEL N.A., DIVEN D. (2020) Vaccinia Treatment & Management: Medical Care, Surgical Care, Consultations Publication: Medscape - eMedicine. [<https://emedicine.medscape.com/article/231773-treatment>] (consulté le 27/03/2020).
- PATIL S.S., GENTSCHEV I., NOLTE I., OGILVIE G., SZALAY A.A. (2012) Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *J Transl Med* 10(10), 3-13
- PETERS C., RABKIN S.D. (2015) Designing herpes viruses as oncolytics. *Mol Ther Oncolytics* 2(2), 15010-15024
- PETROWSKY H., ROBERTS G.D., KOOBY D.A., *et al.* (2001) Functional Interaction between Fluorodeoxyuridine-Induced Cellular Alterations and Replication of a Ribonucleotide Reductase-Negative Herpes Simplex Virus. *J Virol* 75(15), 7050-7058
- REHMAN H., SILK A.W., KANE M.P., KAUFMAN H.L. (2016) Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. *J Immunother Cancer* 4(53), 1-8
- RIES S., KORN W.M. (2002) ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer* 86(1), 5-11
- ROWELL J.L., MCCARTHY D.O., ALVAREZ C.E. (2011) Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med* 17(7), 380-388
- SABA C.F. (2017) Vaccine-associated feline sarcoma: current perspectives. *Vet Med (Auckl)* 8(8), 13-20
- SÁNCHEZ D., CESARMAN-MAUS G., AMADOR-MOLINA A., LIZANO M. (2018) Oncolytic Viruses for Canine Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 10(11), 404-428
- SCHEITHAUER W., ROSEN H., KORNEK G.V., SEBESTA C., DEPISCH D. (1993) Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ* 306(6880), 752-755
- SINGH P.K., DOLEY J., KUMAR G.R., SAHOO A.P., TIWARI A.K. (2012) Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J Med Res* 136(4), 571-584
- STAQUICINI F.I., OZAWA M.G., MOYA C.A., *et al.* (2011) Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. *J Clin Invest* 121(1), 161-173

- STRONG J.E., TANG D., LEE P.W. (1993) Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* 197(1), 405-411
- STRONG J.E., COFFEY M.C., TANG D., SABININ P., LEE P.W. (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17(12), 3351-3362
- STRONG J.E., LEE P.W. (1996) The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J. Virol.* 70(1), 612-616
- SUI H., WANG K., XIE R., *et al.* (2017) NDV-D90 suppresses growth of gastric cancer and cancer-related vascularization. *Oncotarget* 8(21), 34516-34524
- SZELECHOWSKI M., SAÏB A. (2019) Une nouvelle arme contre le cancer : bilan sur les virus oncolytiques. 9(9), 261-271
- TANG W., HE Y., ZHOU S., MA Y., LIU G. (2009) A novel Bifidobacterium infantis-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 28(1), 77-81
- TARBOURIECH N., FLUSIN O., SELE C., ISENI F. (2012) La synthèse du génome des poxvirus. *Virologie* 16(4), 210-224
- TODO T. (2008) “Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh Migr* 2(3), 208-213
- TURNBULL S., WEST E.J., SCOTT K.J., *et al.* (2015) Evidence for Oncolytic Virotherapy: Where Have We Got to and Where Are We Going? *Viruses* 7(12), 6291-6312
- URBASIC A.S., HYNES S., SOMRAK A., *et al.* (2012) Oncolysis of canine tumor cells by myxoma virus lacking the *serp2* gene. *Am. J. Vet. Res.* 73(8), 1252-1261
- VAIL D.M., MACEWEN E.G. (2000) Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Investigation* 18(8), 781-792
- VERMES A., GUCHELAAR H.-J., DANKERT J. (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 46(2), 171-179
- Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. (2016) . *Veterinary and Comparative Oncology* 14(4), 417-446
- WITHROW S.J., MACEWEN’S (2007) Small Animal Clinical Oncology, 4^e ed. Missouri, Elsevier Health Sciences
- WOLLMANN G., OZDUMAN K., VAN DEN POL A.N. (2012) Oncolytic Virus Therapy of Glioblastoma Multiforme – Concepts and Candidates. *Cancer J* 18(1), 69-81

ZEH H.J., DOWNS-CANNER S., MCCART J.A., *et al.* (2015) First-in-man Study of Western Reserve Strain Oncolytic Vaccinia Virus: Safety, Systemic Spread, and Antitumor Activity. *Mol Ther* 23(1), 202-214

ZHUANG S.M., SHVARTS A., VAN ORMONDT H., *et al.* (1995) Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 55(3), 486-489

Annexes

Annexe 1 : Evolution de la température rectale (en °C) de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002.

Chien	Dose (PFU/kg)	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
Chien 1	10 ⁶	38,6	38,6	38,1	38,6	38,8	38,8	38,2	39,4	38,5	39,3	39,1	39,1	37,9	38,4	37,7
Chien 2	5*10 ⁶	38,3	38		38,1	39	8,9	38,4	38	38	37,5	38	38	38,7	38	37,4
Chien 3	10 ⁷	39,3	38,5	38,5	38,8	38,6	38	37,7	37,4	37,8	38,4	38,6	38,6	38,1	37,7	37,6
Chien 4	5*10 ⁷	37,5	37,8	37,5	38,2	38	37,9	38,2	37,3	37	37,4	38,3	38,3	37,4	37,9	

Annexe 2 : Evolution du poids (en kg) de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002.

Chien	Dose (PFU/kg)	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15
Chien 1	10^6	11,8	11,7	11,6	11,8	11,8	12	11,9	11,9	11,9	11,7	11,6	11,6	11,7	11,7	11,5	
Chien 2	$5 \cdot 10^6$	11,6	11,3	11,1	11,1	11	10,9	10,9	11	11	10,8	10,6	10,5	10,6	10,6	10,5	10,6
Chien 3	10^7	9,7	9,9	9,7	9,6	9,6	9,8	9,8	9,5	9,4	9,3	9,4	9,6	9,3	9,4	9,3	
Chien 4	$5 \cdot 10^7$	10	9,9	9,8	9,5	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,5	9,55	9,5	9,3	9,2	

Annexe 3 : Paramètres biochimiques de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002.

Chien 1 (10⁶PFU/kg)

Chien 1	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	Protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	5,4	70	29	56	36	79	5,1	1,2
J14	5,7	75	30	61	63	82	5,9	1,21

*Chien 2 (5*10⁶PFU/kg)*

Chien 2	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	6,8	74	27	51	45	45	4,1	1,45
J11	7,1	77	28	50	42	48	5,2	1,19

Chien 3 (10⁷PFU/kg)

Chien 3	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	9,5	2,38	23	50	44	31	5,8	ND
J9	7,2	73	35	45	42	36	5,7	1,21
J19	7,6	64	24	46	46	36	6,1	1,13

Chien 4 (5*10⁶PFU/kg)

Chien 4	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	Proteine totale (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	6,5	71	31	59	49	37	6,3	1,23
J14	4,4	66	29	60	44	27	4,6	1,24

Annexe 4 : Paramètres hématologiques de l'ensemble des chiens lors de l'injection unique de TG6002.

Chien 1 (10⁶PFU/kg)

	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12,4-19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 µm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)
J0	8,9	6,91	16,6	46,2	66,9	24	277
J14	7,97	6,99	16,8	47,3	67,7	24	286

Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4 - 38,1 g/dL)	Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentés (VU : 0-500 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (%)
0,8	35,9	4,88	54,8	0	3,21	36,1
0,63	35,5	4,08	51,2	0	3,11	39

Monocytes (VU : 0,4-1,6 10 ³ /mm ³)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 10 ³ /mm ³)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 10 ³ /mm ³)	Basophiles (%)
0,51	5,7	0,29	3,3	0,01	0,1
0,51	6,4	0,25	3,1	0,02	0,3

Chien 2 ($5 \cdot 10^6$ PFU/kg)

	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 $10^3/\text{mm}^3$)	Hématies (VU : 5,3-7,9 $10^6/\text{mm}^3$)	Hémoglobine (VU : 12,4- 19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 μm^2)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 $10^3/\text{mm}^3$)
J0	11,41	6,42	16	47,3	73,7	24,9	267
J11	6,64	7,76	17	48,9	72,3	25,1	324

Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4 - 38,1 g/dL)	Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 $10^3/\text{mm}^3$)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 $10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 $10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocytes (%)
0,72	33,8	7,12	62,4	0	3,06	26,8
0,65	34,8	3,54	53,3	0	2,31	34,8

Monocytes (VU : 0,4-1,6 $10^3/\text{mm}^3$)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 $10^3/\text{mm}^3$)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 $10^3/\text{mm}^3$)	Basophiles (%)
0,82	7,2	0,37	3,2	0,04	0,4
0,51	7,7	0,24	3,6	0,04	0,6

Chien 3 (10⁷ PFU/kg)

	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12,4-19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 μm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)
J0	8,77	5,86	13,8	38,8	66,2	23,5	342
J9	8,9	6,22	14,8	40,9	65,8	23,8	442
J19	8,16	6,21	14,8	40,9	65,9	23,8	432

Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4 - 38,1 g/dL)	Neutrophile (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (%)
1,16	35,6	6,55	74,7	0	1,69	19,3
0,74	36,2	6,23	70	0	2,15	24,2
0,22	36,2	5,28	64,7	0	2,21	27,1

Monocytes (VU : 0,4-1,6 10 ³ /mm ³)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 10 ³ /mm ³)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 10 ³ /mm ³)	Basophiles (%)
0,37	4,2	0,14	1,6	0,02	0,2
0,36	4	0,14	1,6	0,02	0,2
0,53	6,5	0,13	1,6	0,01	

Chien 4 (5*10⁷PFU/kg)

	Leucocytes (10 ³ /mm ³)	Hématies (10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (g/dL)	Hématocrite (%)	Volume globulaire moyen (ym ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg)	Plaquettes (10 ³ /mm ³)
J0	9,65	7,47	17,8	50,3	67,3	23,8	307
J1 4	8,55	7,72	18,4	51,3	66,5	23,8	403

Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4 - 38,1 g/dL)	Neutrophile (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (%)
0,51	35,4	7,67	79,5	0	1,49	15,4
0,75	35,9	5,23	61,1	0	1,47	28,9

Monocytes (VU : 0,4-1,6 10 ³ /mm ³)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 10 ³ /mm ³)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 10 ³ /mm ³)	Basophiles (%)
0,43	4,5	0,04	0,4	0,02	0,2
0,51	6	0,3	3,5	0,04	0,5

Annexe 5 : Excrétion virale de l'ensemble des chiens lors de l'étude d'injection unique du TG6002.

Titration de la charge virale

Titrage			Chien 1 (dose de 10^6 PFU/kg)	Chien 2 (dose de $5 \cdot 10^6$ PFU/kg)	Chien 3 (dose de 10^7 PFU/kg)	Chien 4 (dose de $5 \cdot 10^7$ PFU/kg)
Sang	T0	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+24h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+48h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
Urine	T0	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+24h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+48h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
Salive	T0	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+24h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+48h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND

Fèces	T0	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+24h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND
	T0+48h	100µl	ND	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND	ND

ND : non détecté

Charge virale par qPCR

qPCR		Chien 1 (10^6 PFU/kg)	Chien 2 ($5 \cdot 10^6$ PFU/kg)	Chien 3 (10^7 PFU/kg)	Chien 4 ($5 \cdot 10^7$ PFU/kg)
Sang	T0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+24h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+248h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Urine	T0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+24h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+48h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salive	T0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+24h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+48h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fèces	T0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+24h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	T0+48h	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

LOD : limite de détection : 40 copies/10µL d'échantillon

Annexe 6 : Evolution de la concentration sérique en 5-FC et 5-FU durant les 12h suivant une prise

		T (heure)	5-FC $\mu\text{g/ml}$ of serum	5-FU $\mu\text{g/ml}$ of serum
Chien 8	J0	0	0,00	0,00
		23min	4,88	0,00
		33min	28,92	0,00
		45min	52,14	0,00
		1h	76,56	0,00
		1h30	92,27	0,00
		2h	83,16	0,00
		6h	29,53	0,00
		8h	17,48	0,00
		12h	7,93	0,00
	J7	0	15,61	0,00
		15min	14,84	0,00
		30min	18,07	0,00
		47min	43,25	0,00
		1h	61,24	0,00
		1h30	83,70	0,00
		2h	93,79	0,00
		6h	39,18	0,00
		8h30	20,79	0,00
12h30		13,93	0,00	
Chien 9	J0	0	0,00	0,00
		15min	0,11	0,00
		30min	15,68	0,00
		45min	51,37	0,00
		1h	73,58	0,00
		1h30	78,33	0,00
		2h	77,40	0,00
		5h45	32,82	0,00
		7h30	19,66	0,00
		11h	10,81	0,00
	J7	0	12,79	0,00
		15min	12,27	0,00
		30min	27,77	0,00
		45min	58,12	0,00
		1h	70,51	0,00
		1h30	97,37	0,00

Chien 10	J7	2h	99,44	0,00	
		5h45	35,45	0,00	
		8h30	19,28	0,00	
		10h30	12,42	0,00	
	J0	0	0,00	0,00	
		15min	0,37	0,00	
		30min	5,89	0,00	
		45min	29,97	0,00	
		1h	48,05	0,00	
		1h30	71,60	0,00	
		2h	82,90	0,00	
		5h30	29,93	0,00	
		7h30	17,65	0,00	
		10h45	6,79	0,00	
		J7	0	9,75	0,00
			15min	8,95	0,00
	30min		14,36	0,00	
	45min		29,61	0,00	
	1h		42,20	0,00	
	1h30		61,42	0,00	
2h	75,88		0,00		
5h48	42,13		0,00		
8h45	19,19		0,00		
10h30	13,01		0,00		

Annexe 7 : Evolution du poids (en kg) de l'ensemble des chiens lors de l'administration répétée de 5-FC

Poids (kg)	J0	J7	J13	Variation de poids
Chien 8	11	12,8	11,7	6%
Chien 9	16,9	16,9	15,5	-8%
Chien 10	15,4	15,2	15,5	1%

Annexe 8 : Paramètres biochimiques de l'ensemble des chiens lors de l'administration répétée de 5-FC.

Chien 8	Urée (VU : 0,2-0,6 g/L)	Créatinine (VU : 4,1-12 mg/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 0,8-1,2 g/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	0,24	8	33	56	29	67	0,73	1,15
J7	0,26	7	32	55	29	65	0,69	1,4
J14	0,24	8	32	51	23	67	1,04	1,24

Chien 9	Urée (VU : 0.2-0.6 g/L)	Créatinine (VU : 4.1-12 mg/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 0,8-1,2 g/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	0,28	6	35	56	41	94	0,75	1,35
J7	0,31	7	35	58	33	94	0,71	1,43
J14	0,29	9	32	56	27	122	1,22	1,21

Chien 10	Urée (VU : 0,2-0,6 g/L)	Créatinine (VU : 4,1-12 mg/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 0,8-1,2 g/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	0,17	5	32	52	31	144	0,73	1,32
J7	0,23	5	33	54	27	107	0,8	1,29
J14	0,27	6	31	54	20	93	1,01	1,1

Annexe 9 : Paramètres hématologiques de l'ensemble des chiens lors de l'administration répétée de 5-FC.

Chien 8	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12.4-19.2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 µm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21.9-26.3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)	Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	7,940	7,26	16,6	46,5	64	22,9	215	0,91	35,7
J7	7,790	7,64	17,7	48,4	63,4	23,2	247	1,04	36,6
J14	6,340	8,21	19,0	51,2	62,4	23,1	266	2,18	37,1

Chien 8	Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Monocytes (VU : 400-1600 /mm ³)	Eosinophiles (VU : 100-1500/mm ³)	Basophiles (VU : 0-100/mm ³)
J0	4,288	1,906	318	1426	0
J7	4,630	1,800	340	1010	10
J14	3,810	1,580	490	450	10

Chien 9	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12.4-19.2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 μm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21.9-26.3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)	Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	9,840	7,11	16,4	43,3	60,9	23,1	221	0,67	37,9
J7	7,690	7,41	16,7	47,3	63,8	22,5	303	0,78	35,3
J14	10,010	8,78	20,0	52,9	60,3	22,8	336	1,02	37,8

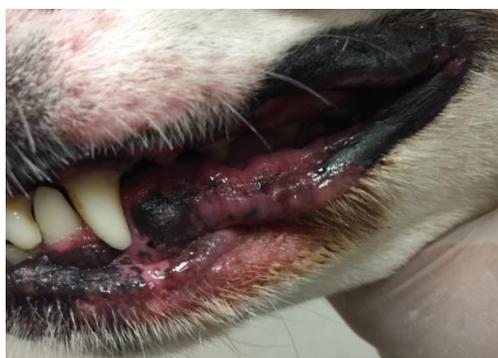
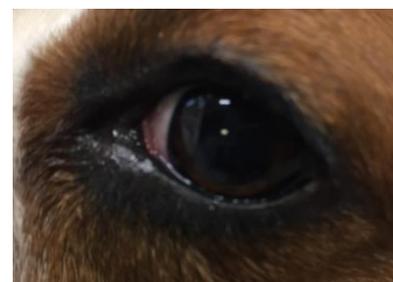
Chien 9	Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Monocytes (VU : 400-1600 /mm ³)	Eosinophiles (VU : 100-1500/mm ³)	Basophiles (VU : 0-100/mm ³)
J0	6,230	2,860	300	430	20
J7	4,660	1,970	660	380	20
J14	6,950	1,650	1100	270	40

Chien 10	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12.4-19.2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 µm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21.9-26.3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)	Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	14,810	6,02	14,3	40,2	66,8	23,8	379	0,41	35,6
J7	10,750	5,89	13,9	40,5	68,8	23,6	409	0,51	34,3
J14	8,880	7,36	17,7	49,4	67,1	24,0	359	1,40	35,8

Chien 10	Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Monocytes (VU : 400-1600 /mm ³)	Eosinophiles (VU : 100-1500/mm ³)	Basophiles (VU : 0-100/mm ³)
J0	10,220	3,690	600	280	20
J7	6,740	3,480	540	250	10
J14	4,020	2,960	1680	190	30

Annexe 10 : Photographies des lésions cutanées lors de l'administration répétée de 5-FC.

Photographies lors de l'arrêt du traitement



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 8 à J14

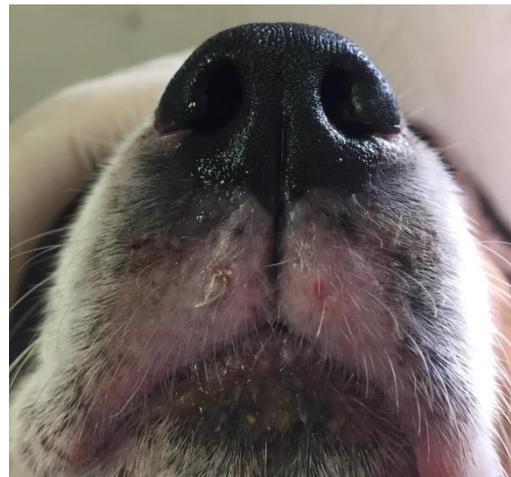


Photographies des lésions cutanées faciales du chien 9 à J14



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 10 à J14

Photographie de l'évolution des lésions après l'arrêt du traitement



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 8 à J21



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 8 à J24



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 8 à J29



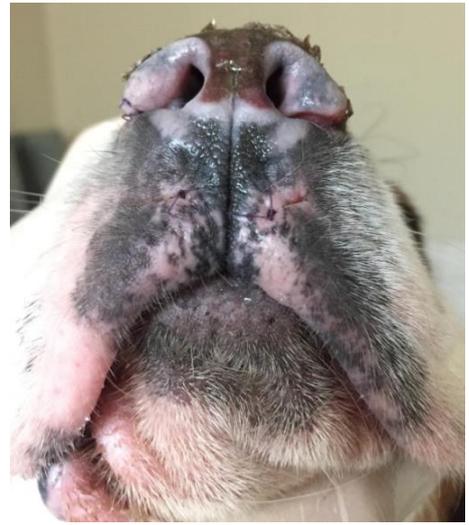
Photographies des lésions cutanées faciales du chien 9 à J17



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 9 à J24



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 9 à J25



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 9 à J29



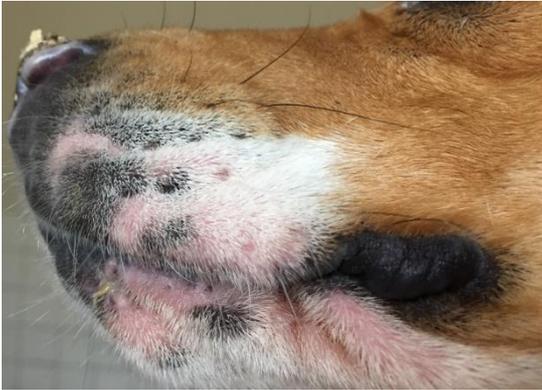
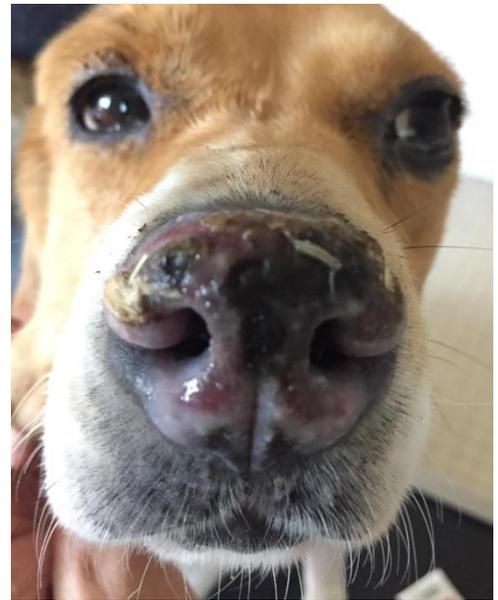
Photographies des lésions cutanées faciales du chien 10 à J14



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 10 à J21



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 10 à J25



Photographies des lésions cutanées faciales du chien 10 à J29

Annexe 11 : Evolution de la température rectale (en °C) de l'ensemble des chiens lors de l'injection répétée de TG6002.

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19
Chien 5	38,6	38,4	38,7	37,9	38,4	38,7	39,2	38,9	38,9	38,75	38,6	3,6	38,9	38,8	38,1	37,1	37,9	38,5	38,1	38
Chien 6	3,6	39,1	38,5	38,4	37,4	38,9	39,2	39,1	38,9	38,42	37,8	38,3	38,8	38,4	38,7	38,3	38,4	38,2	38,5	38,2
Chien 7	38,5	38,9	38,7	38,9	38,4	38,8	38,9	38,9	38,9	38,3	38,2	38	38,6	38,2	38,3	38,6	38,6	38	38,1	38,3

	J20	J21	J22	J23	J24	J25	J28	J29	J30	J31	J32	J35
Chien 5	38	38,5	38,3	38,3	38	38,4	38,8	38,9	38,86	38,3	38,6	39,8
Chien 6	38,7	39,1	38,2	38,2	38,1	38,9	39,1	38,7	38,96	38	38,5	39
Chien 7	38,7	38,7	38,2	38,4	38,1	38,9	39,3	39,3	39,4	38,1	39,3	38,88

Annexe 12 : Evolution du poids (en kg) de l'ensemble des chiens lors de l'injection répétée de TG6002.

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19
Chien 5	8,5	8,4	8,35	8,2	8,5	8,3	8,3	8,7	8,7	8,7	8,7	8,6	8,7	8,8	8,9	7,6	7,5	7,45	7,4	7,3
Chien 6	10	10,1	10,1	9,8	10,3	9,9	10	10,1	10,2	10,3	10,15	10,2	10,1	10	10,4	10,4	10,1	10,3	10	9,8
Chien 7	11,4	11,4	11,3	11	11,4	11,4	11,2	11,3	11,2	11,2	11,3	11,2	11,2	11,2	11,4	11,5	11,3	11,2	11	11,1

	J20	J21	J22	J23	J24	J25	J28	J29	J30	J31	J32	J35
Chien 5	7,3	7,7	7,6	7,75	7,85	7,7	7,8	7,75	8,05	8	8,6	7,9
Chien 6	9,7	9,85	9,8	10	9,9	10	9,7	9,75	9,8	9,9	10,05	9,7
Chien 7	11,1	11	11,1	11	11	11	10,9	10,8	10,7	10,8	10,8	10,65

Annexe 13 : Paramètres biochimiques de l'ensemble des chiens lors des injections répétées de TG6002.

Chien 5

	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	2,9	66	29	59	43	46	4,7	11,12
J16	5,3	64	28	56	36	143	5,8	1,25
J35	3,1	71	26	54	41	55	4,6	1,25

Chien 6

	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	4,9	62	28	61	34	37	5,3	1,2
J16	6	72	26	53	27	52	ND	1,22
J35	3,9	56	28	59	44	36	3,4	1,25

Chien 7

	Urée (VU : 2,4-9,4 mmol/L)	Créatinine (VU : 40-159µmol/L)	Albumine (VU : 24-38 g/L)	protéines totales (VU : 60-81 g/L)	ALAT (VU : 20-133 UI/L)	PAL (VU : 29-153 UI/L)	Glucose (VU : 4,2-6,7 mmol/L)	Calcium ionisé (VU : 1,2-1,5 mmol/L)
J0	7,8	75	24	50	28	50	5,7	1,18
J16	12,7	51	24	58	39	158	5,6	1,19
J35	4	60	24	50	26	37	5,3	1,2

Annexe 14 : Paramètres hématologiques de l'ensemble des chiens lors des injections répétées de TG6002.

Chien 5

	Leucocyte (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12,4-19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 µm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)	Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	6,57	8,1	18,4	52,2	64,4	22,7	302	0,67	64,4
J9	14,21	6,71	15,6	43,7	65,1	23,2	272	0,56	65,1
J16	7,08	6,61	15,2	43,9	66,4	23	286	0,71	66,4
J23	7,4	7,39	17,2	49,2	66,6	23,3	375	0,99	66,6
J35	4,96	7,26	17,3	48,2	66,4	23,8	303	0,43	66,4

Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (%)	Monocytes (VU : 0,4-1,6 10 ³ /mm ³)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 10 ³ /mm ³)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 10 ³ /mm ³)	Basophiles (%)
6,57	62,5	0	1,68	25,6	0,5	7,6	0,24	3,7	0,04	0,6
14,21	72,6	0	2,44	17,2	1,21	8,5	0,22	1,5	0,03	0,2
7,08	71,3	0	1,34	18,9	0,51	7,2	0,18	2,5	0,01	0,1
7,4	59,7	0	2,06	27,6	0,8	10,5	0,11	1,5	0,04	0,5
4,96	55	0	1,6	32,3	0,46	9,3	0,14	2,8	0,03	0,6

Chien 6

	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 10 ³ /mm ³)	Hématies (VU : 5,3-7,9 10 ⁶ /mm ³)	Hémoglobine (VU : 12,4-19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 μm ²)	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 10 ³ /mm ³)	Réticulocytes (%)	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	7,13	7,32	17,7	48,5	66,3	24,2	331	0.69	66.3
J9	8,78	7,3	17,8	48,5	66,4	24,4	321	0.71	66.4
J16	6,09	6,5	15,6	44,4	68,3	24	299	0.63	66.3
J23	8,32	6,52	15,9	44,6	68,4	24,4	371	0.53	66.4
J35	7,12	7,54	18,7	50,1	66,4	24,8	353	0.49	66.4

Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 10 ³ /mm ³)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (%)	Monocytes (VU : 0,4-1,6 10 ³ /mm ³)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 10 ³ /mm ³)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 10 ³ /mm ³)	Basophiles (%)
7,13	62,2	0	1,42	19,9	0,79	11,1	0,38	5,3	0,11	1,5
8,78	63,9	0	1,79	20,4	0,91	10,4	0,38	4,3	0,09	1
6,9	73,1	0	0,87	14,3	0,53	8,7	0,24	3,9	0	0
8,82	62,8	0	1,88	21,3	1,01	11,5	0,3	3,4	0,09	1
7,12	58,2	0	1,57	22,1	1	14	0,28	3,9	0,13	1,8

Chien 7

	Leucocytes (VU : 5,6-20,4 $10^3/\text{mm}^3$)	Hématies (VU : 5,3-7,9 $10^6/\text{mm}^3$)	Hémoglobine (VU : 12,4-19,2 g/dL)	Hématocrite (VU : 35-52 %)	Volume globulaire moyen (VU : 60-71 μm^2)	Teneur corpulaire moyenne en hémoglobine (VU : 21,9-26,3 pg)	Plaquettes (VU : 64-613 $10^3/\text{mm}^3$)	Réticulocytes (%)	Concentration corpulaire moyenne en hémoglobine (VU : 34,4-38,1 g/dL)
J0	9,48	6,68	14,9	42,6	63,8	22,3	402	0,35	63,8
J9	10,2	6,51	14,7	41,2	63,3	22,6	349	1,08	63,3
J16	6,99	7,45	16,8	16,1	61,9	22,6	534	0,79	31,9
J23	14,3	5,47	12,4	35,9	65,6	22,7	461	0,49	65,6
J35	5,41	6,27	14,6	40,8	65,1	23,3	386	1,2	65,1

Neutrophiles (VU : 2,9-13,6 $10^3/\text{mm}^3$)	Neutrophiles (%)	Neutrophiles non segmentées (VU : 0-500 $10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocytes (VU : 1,1-5,3 $10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocytes (%)	Monocytes (VU : 0,4-1,6 $10^3/\text{mm}^3$)	Monocytes (%)	Eosinophiles (VU : 0,1-1,5 $10^3/\text{mm}^3$)	Eosinophiles (%)	Basophiles (VU : 0-0,1 $10^3/\text{mm}^3$)	Basophiles (%)
9,48	73,5	0	1,71	118	0,67	7,1	0,11	1,2	0,02	0,2
10,25	67,9	0	2,33	22,7	0,79	7,7	0,13	1,3	0,04	0,4
6,99	65,1	0	0,84	12	1,53	21,9	0,07	1	0	0
14,3	76,3	0	2,3	16	0,98	6,9	0,08	0,6	0,03	0,2
5,41	50,3	0	2,1	38,3	0,5	8,5	0,1	2	0,05	0,9

Annexe 15 : Excrétion virale de l'ensemble des chiens lors de l'étude des injections répétées du TG6002.

Titration par culture cellulaire de la charge virale dans le sang

			Chien 5	Chien 6	Chien 6
Sang	J0	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J1	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J2	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J7	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J8	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J9	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J14	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J15	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J16	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J21	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
J35	100µl	ND	ND	ND	
	10µl	ND	ND	ND	

ND : non détecté

Titration par culture cellulaire de la charge virale dans l'urine

Urine	J0	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J1	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J2	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J7	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J8	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J9	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J14	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J15	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J16	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J21	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
J35	100µl	ND	ND	ND	
	10µl	ND	ND	ND	

Titration par culture cellulaire de la charge virale dans la salive

Salive	J0	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J1	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J2	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J7	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J8	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J9	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J14	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J15	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J16	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
	J21	100µl	ND	ND	ND
		10µl	ND	ND	ND
J35	100µl	ND	ND	ND	
	10µl	ND	ND	ND	

Charge virale dans les fluides corporels par qPCR

qPCR		Chien 1 : 3202	Chien 2 : 3218	Chien 3 : 3314
Sang	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	g	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	<LOD
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD
Urine	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	<LOD
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD
Salive	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	<LOD
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD
Fèces	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	<LOD

	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD

qPCR		Chien 1 : 3202	Chien 2 : 3218	Chien 3 : 3314
Sang	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	g	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	ND
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD
Urine	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	ND
	J16	<LOD	<LOD	ND
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD
Salive	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	ND
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD

LOD : limite de détection : 40 copies/10µL d'échantillon

Charge virale dans les fèces par qPCR

Fèces	J0	<LOD	<LOD	<LOD
	J1	<LOD	<LOD	<LOD
	J2	<LOD	<LOD	<LOD
	J7	<LOD	<LOD	<LOD
	J8	<LOD	<LOD	<LOD
	J9	<LOD	<LOD	<LOD
	J14	<LOD	<LOD	<LOD
	J15	<LOD	<LOD	<LOD
	J16	<LOD	<LOD	<LOD
	J21	<LOD	<LOD	<LOD
	J35	<LOD	<LOD	<LOD

ÉTUDE DE TOLÉRANCE D'UN VIRUS ONCOLYTIQUE DÉRIVÉ DU VIRUS DE LA VACCINE ARMÉ D'UN GÈNE THÉRAPEUTIQUE CHEZ DES CHIENS BEAGLES SAINS

AUTEUR : Anaïs CORTEYN

RÉSUMÉ :

La virothérapie oncolytique est une thérapie ciblée permettant la lutte contre les tumeurs non opérables et résistantes aux traitements conventionnels. Cette thérapie est basée sur l'injection de virus génétiquement modifiés se répliquant dans les cellules tumorales entraînant ainsi leurs lyses et parfois l'expression des protéines thérapeutiques.

Les similitudes entre les tumeurs canines et humaines font du chien un bon modèle lors d'étude translationnelle. Cela nécessite cependant dans un premier temps la réalisation d'étude de tolérance chez les chiens sains puis d'études d'efficacité chez des chiens présentant un cancer spontané.

L'objectif de ce travail est de vérifier l'innocuité du TG6002, de la 5-flucytosine puis de la combinaison des deux. Le TG6002 est un virus dérivé du virus de la vaccine doublement délété et armé d'un gène thérapeutique. Les délétions permettent un ciblage des cellules tumorales. Le gène thérapeutique *FCU1* permet la transformation d'une pro-drogue, la 5-flucytosine, en molécule cytotoxique le 5-fluorouracil. Le second objectif est de vérifier l'absence d'excrétion virale dans l'environnement lors d'injection de TG6002.

L'injection unique de TG6002 par voie intramusculaire chez quatre chiens sains a permis de constater une bonne tolérance sur la base des examens cliniques, hématologiques et biochimiques et de définir la dose maximale tolérée (5×10^7 PFU/kg).

L'administration de la 5-flucytosine (200mg/kg/jour) par voie orale à 3 chiens beagles sains a entraîné l'apparition de lésions cutanées localisées aux babines, au philtrum, aux pourtours des yeux et au scrotum. Ces lésions sont apparues après 10 jours chez tous les animaux de l'étude et ont rétrocedé lors de l'arrêt de la 5-flucytosine. Aucun effet secondaire clinique, hématologique ou biochimique n'a été constaté.

Trois injections intramusculaires de TG6002 (5×10^7 PFU/kg) à 7 jours d'intervalles associées à l'administration de la 5-FC (200mg/kg/j) pendant 21 jours ont été réalisées chez trois chiens sains. Lors de cette étude, un chien a présenté des troubles digestifs ayant rétrocedé avec les traitements. Aucun effet secondaire majeur n'a été mis en évidence chez les deux autres chiens. Aucune anomalie hématologique ou biochimique n'a été constatée.

Ces études ont également permis de vérifier l'absence d'excrétion virale de TG6002 dans l'environnement.

La bonne tolérance du TG6002 en association à la 5-flucytosine chez des chiens sains permet d'envisager la réalisation d'étude d'efficacité chez des chiens atteints de tumeurs spontanées résistantes aux traitements conventionnels.

Mots clé : VIRUS ONCOLYTIQUE / VIRUS DE LA VACCINE / THÉRAPIE GÉNIQUE / CANCÉROLOGIE / VIROTHÉRAPIE / TOLÉRANCE / ANIMAL SAIN / CHIEN

JURY :

Président : Pr Nicolas DE PROST

1^{er} Assesseur : Dr Christelle MAUREY

2nd Assesseur : Pr Sophie LE PODER

SAFETY STUDY OF AN ONCOLYTIC VIRUS DERIVED FROM VACCINIA VIRUS AND ARMED WITH A THERAPEUTIC GENE ON HEALTHY BEAGLES DOGS

AUTHOR: Anaïs CORTEYN

SUMMARY:

The oncolytic virotherapy is a target therapy allowing the fight against unresectable and conventional treatment resistant tumors. Genetical modification of some virus allows a replication and lysis in cancerous cells only. Oncolytic virotherapy is based on injections of virus replicating in tumor cells, leading to their lyses and sometimes to the expression of therapeutic proteins.

Similarities of canine and human tumors make the dog a good translational model for studies. It allows in a first approach safety in healthy dog and thus efficacy studies in dogs with spontaneous tumors.

The aim of this study is to check TG6002 tolerance paired with 5-FC. TG6002 is a vaccinia virus double deletion and armed with therapeutic gene. The deletions allow targeting tumoral cells. The therapeutic gene FCU1 allows to transform pro-drug 5-FC into a cytotoxic drug 5-fluorouracil. The second aim is to check the lack of environmental viral shedding.

The unical intramuscular injection of TG6002 on four healthy dogs allowed us to show a good tolerance based on clinical, haematological, biochemical examinations and to determine the maximal tolerated dose which is 5×10^7 PFU/kg.

Daily administration of 5-flucytosine (200mg/kg/day) on 3 healthy beagle dogs created some cutaneous lesions located in chops, philtrum, around eyes and on scrotum for the male. Those lesions appeared between 10 days after the treatment beginning on all studied animals. They retroceded since the 5-flucytosine was stopped. No other side effects as clinical, haematological or biochemical was observed.

Three intramuscular injections of TG6002 (5×10^7 PFU/kg) every seven days paired with the administration of 5-FC (200mg/kg/day) during 21 days has been done on three healthy dogs. During this study, digestive disorders healing with the treatment appeared. No major side effect was highlighted on other dogs. No haematological or biological side effects have been noticed.

The lack of environmental viral shedding was checked during these studies.

The good tolerability of TG6002 paired with 5-flucytosine on healthy dogs enables efficacy studies in dogs with spontaneous tumors.

Key words: ONCOLYTIC VIRUS / VACCINIA VIRUS / GENE THERAPY / CANCEROLOGY / VIROTHERAPY / TOLERANCE / HEALTHY ANIMAL / DOG

JURY:

Président: Pr Nicolas DE PROST

1^{er} Assesseur: Dr Christelle MAUREY

2nd Assesseur: Pr Sophie LE PODER