

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	5
INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES.....	5
INTRODUCTION.....	7
1^{ERE} PARTIE : L'IMMUNITE ANTITUMORALE ET SES IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES	9
I MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERACTION TUMEUR-SYSTEME IMMUNITAIRE	9
1 <i>Stabilisation de la croissance des tumeurs et régressions spontanées</i>	9
2 <i>Mise en évidence d'une réponse immune anti-tumorale au sein de la tumeur</i>	9
3 <i>Le concept d'immunosurveillance</i>	10
II LES DIFFERENTS MECANISMES IMPLIQUES.....	11
1 <i>Immunité innée</i>	11
1.1 Les cellules phagocytaires : macrophages et neutrophiles	11
1.2 Le complément.....	12
1.3 Les cellules Natural Killer	13
2 <i>L'immunité acquise</i>	14
2.1 Réponse immune à médiation humorale.....	14
2.2 Réponse immune à médiation cellulaire.....	14
3 <i>Mécanismes intervenant à la fois dans les immunités innées et acquises</i>	15
3.1 Rôle des cytokines dans l'immunosurveillance.....	15
3.2 Les IKDC : Interféron-producing killer dendritic cells	16
4 <i>Bilan : induction d'une réponse immune de rejet tumoral</i>	17
III ECHAPPEMENT DES CANCERS AU SYSTEME IMMUNITAIRE	18
1 <i>Compétence immunitaire et cancer</i>	18
2 <i>Les Mécanismes d'échappement élaborés par la tumeur</i>	19
2.1 Pouvoir immunogène faible des tumeurs et détournement de la réponse immunitaire.....	19
2.2 Altérer le fonctionnement du système immunitaire.....	19
3 <i>Les défaillances du système immunitaires compétent</i>	20
3.1 Les Lymphocytes T régulateurs.....	20
3.2 Autres mécanismes immunitaires en faveur de la progression tumorale.....	21
3.3 Inflammation et cancer	21
3.4 Sélection des cellules peu immunogènes par le système immunitaire	22
IV L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE	23
1 <i>Immunothérapie passive</i>	23
1.1 Spécifique : thérapie à base d'anti-corps monoclonaux	23
1.2 L'administration de cellules immunitaires.....	24
2 <i>Immunothérapie active</i>	25
2.1 Immunothérapie non spécifique.....	25
2.1.1 Avec des bactéries ou des composants bactériens	25
2.1.2 Par injection de cytokines recombinantes.....	25
2.2 Immunothérapie spécifique : la vaccination anti-tumorale.....	25
2.2.1 Principe	26
2.2.2 Nature de l'agent vaccinal	26
2.2.3 Support utilisé pour la présentation des antigènes.....	28
2.2.4 Bilan : choix de la technique vaccinale et résultats.	29

3	<i>Les antigènes tumoraux</i>	31
3.1	Caractéristiques d'un gène codant pour un antigène de rejet tumoral potentiel	31
3.2	Les différents antigènes tumoraux	32
3.2.1	Les antigènes partagés avec le soi	32
3.2.2	Les antigènes spécifiques de la tumeur.....	32
3.3	Les techniques de mise en évidence des antigènes tumoraux.....	33
3.3.1	Approche génétique	33
3.3.2	Approche biochimique.....	33
3.3.3	Immunologie inverse	33
4	<i>S'opposer aux mécanismes d'échappement tumoral</i>	34

2^{EME} PARTIE : ETUDE COMPARATIVE DES TUMEURS VESICALES DU CHIEN ET DE L'HOMME **37**

I. CARACTERISTIQUES D'UN BON MODELE ANIMAL..... **37**

II. EPIDEMIOLOGIE, IMPORTANCE **37**

1	<i>Chez l'homme</i>	37
2	<i>Chez le chien</i>	38

III. ETIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES **38**

1	<i>Facteurs extrinsèques</i>	38
1.1	Le tabagisme	38
1.2	La profession.....	38
1.3	Les infections urinaires chroniques	39
1.4	Autres facteurs	39
2	<i>Facteurs intrinsèques</i>	40
2.1	Le sexe	40
2.2	Le nombre d'enfants	41
2.3	L'origine ethnique / la race de chien.....	41
2.4	Les cancers de la vessie familiaux	41
2.5	L'âge	41
2.6	L'obésité	42

IV. TYPES HISTOLOGIQUES ET CLASSIFICATIONS **42**

1	<i>Les types histologiques fréquemment rencontrés</i>	42
2	<i>Classification TNM des tumeurs vésicales</i>	42
2.1	Définition	42
2.2	Fréquence des différents stades	44
3	<i>Classification / grading des tumeurs vésicales</i>	45
3.1	Définition	45
3.2	Grades les plus fréquemment rencontrés	46

V. LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET ARCHITECTURALES DES TUMEURS

VESICALES..... **46**

1	<i>Localisations préférentielles des tumeurs</i>	46
2	<i>Architecture des tumeurs vésicales</i>	47

VI. COMPORTEMENT BIOLOGIQUE..... **47**

1	<i>Localisation et fréquence des extensions locorégionales et des métastases</i>	47
2	<i>Facteurs de progression et de pronostic</i>	48
2.1	Chez l'homme	48
2.2	Chez le chien.....	51

VII. ANOMALIES MOLECULAIRES COMMUNES..... **52**

1	<i>Altération du gène suppresseur de tumeur p53</i>	52
2	<i>Les facteurs pro-angiogéniques et facteurs de croissance</i>	54
3	<i>Surexpression de la cyclooxygénase-2 (COX-2)</i>	55

VIII. REPONSES AUX TRAITEMENTS CONVENTIONNELS.....	56
1 <i>Chez l'homme</i>	56
1.1 Traitement des cancers superficiels de la vessie.....	56
1.1.1 Résection transurétrale vésicale (RTUV)	57
1.1.2 Traitements adjuvants à la résection transurétrale vésicale	57
1.1.3 La cystectomie	59
1.2 Cancer infiltrant de la vessie, et cancer métastasé.....	59
1.2.1 Traitement chirurgical.....	59
1.2.2 Chimiothérapie peri-opératoire dans le cadre d'une cystectomie radicale	61
1.2.3 Alternatives à la cystectomie radicale.....	62
1.2.4 Cas des tumeurs non résécables, et métastasées.....	62
1.3 Les nouvelles approches thérapeutiques.....	62
1.4 Tableau récapitulatif du choix du traitement en fonction du stade TNM.....	64
2 <i>Chez le chien</i>	65
2.1 Traitement chirurgical.....	65
2.1.1 Cystectomie partielle	65
2.1.2 Cystectomie complète.....	66
2.2 Traitement médical utilisant des drogues anti-cancéreuses.....	66
2.2.1 La chimiothérapie intravésicale	66
2.2.2 Traitement médical au piroxicam	66
2.2.3 La chimiothérapie systémique	68
2.3 La radiothérapie	69
IX. BILAN.....	70

3^{EME} PARTIE : L'IMMUNOTHÉRAPIE DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS

VESICALES.....	73
I. PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DES CANCERS DE LA VESSIE	73
II. IMMUNOTHERAPIE PASSIVE DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS SUPERFICIELS DE VESSIE	74
1 <i>Anticorps monoclonaux</i>	74
2 <i>Cellules immunitaires</i>	74
III. IMMUNOTHERAPIE ACTIVE DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS SUPERFICIELS DE VESSIE	75
1 <i>Agents stimulants d'origine non humaine</i>	75
1.1 Etude de la BCG thérapie	75
1.1.1 Principe	75
1.1.2 Résultats / critères d'utilisation.....	77
1.1.3 Inconvénients / limites	77
1.2 Autres études :.....	79
1.2.1 L'hémocyanine de patelle	79
1.2.2 Principaux autres agents étudiés	80
2 <i>Cytokines</i>	81
2.1 Interférons	81
2.2 Interleukine 2	82
2.3 Interleukine 12	82
2.4 Tumor Necrosis Factor α (TNF- α).....	83
3 <i>Thérapie immunogénique</i>	83
IV. ETUDE PARTICULIERE DE LA VACCINATION ANTI-TUMORALE	84
1 <i>Les principaux antigènes tumoraux des tumeurs vésicales chez l'homme</i>	84
1.1 Expression des antigènes du mélanome (MAGE)	85
1.2 Expression des gènes New York Esophageous 1 (NY-ESO-1) et du L antigène 1 (LAGE-1).....	86
1.3 Expression des antigènes B (BAGE).....	87

1.4	Autres antigènes mis en évidence	87
1.4.1	Etude particulière de p53	88
1.4.2	Etude particulière de KIAA0205	89
1.4.3	Autres antigènes	89
2	<i>Essais de vaccination déjà réalisés chez l'homme et résultats</i>	89
3	<i>Discussion et perspectives</i>	90
V.	L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS VESICALES CHEZ LE CHIEN.....	91

4^{EME} PARTIE : SYNTHÈSE : ETUDE DU CHIEN COMME MODELE D'ETUDE POSSIBLE POUR LA VACCINATION ANTITUMORALE. 93

I.	NECESSITE D'UN NOUVEAU MODELE ET INTERET DU CHIEN	93
1	<i>Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cancers de la vessie chez l'homme</i>	93
2	<i>Limites des modèles murins et intérêt du chien comme modèle d'étude</i>	93
II.	SIMILITUDES DES CANCERS DE LA VESSIE HOMME/CHIEN ET PERSPECTIVES	94
III.	ANTIGENES SPECIFIQUES DES TUMEURS VESICALES DECRITS CHEZ LE CHIEN	95
1	<i>Mise en évidence d'un antigène commun à l'homme et au chien, reconnu par l'anticorps monoclonal de rat RS-11</i>	95
2	<i>Expression de la glycoprotéine associée aux tumeurs 72 : TAG 72</i>	96
3	<i>Expression des cytokératines 7 et 20, et de l'urolakine III</i>	97
4	<i>Expression de la protéine p53</i>	98
IV.	ETUDES DE VACCINATION ANTITUMORALE DEJA REALISEES CHEZ LE CHIEN	99
V.	APPLICATION PRATIQUE	99
1	<i>Sélection des candidats</i>	99
1.1	Qui dépister ?	99
1.2	Avec quels outils pourrait-on dépister ? Et poser un diagnostic ?	100
1.2.1	Suspicion : Analyse urinaire :	100
1.2.2	Visualiser la masse :	101
1.2.3	Diagnostic de certitude : analyse histologique → description des différentes techniques :	101
1.3	Choix des candidats	104
2	<i>Exérèse chirurgicale de la masse</i>	104
3	<i>Préparation des vaccins canins à base de cellules dendritiques</i>	104
3.1	Choix de l'antigène	104
3.2	Obtention de cellules dendritiques canines à partir des cellules mononucléées du sang périphérique	104
3.3	Les différentes méthodes utilisables pour charger les cellules dendritiques avec les antigènes tumoraux	105
4	<i>Protocole de vaccination</i>	105
5	<i>Méthode d'évaluation de la réponse au traitement</i>	105
VI.	SYNTHÈSE	106

CONCLUSION 107

ANNEXES 109

BIBLIOGRAPHIE..... 117

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : <i>Antibody Dependent Cell Cytotoxicity</i>	IFN : <i>Interféron</i>
AC : <i>Anticorps</i>	LAGE : <i>L antigens</i>
ACm : <i>Anticorps monoclonal</i>	LAK : <i>Lymphocyte Activated Killer</i>
AINS : <i>Anti-inflammatoire non stéroïdien</i>	MAGE : <i>Antigènes du mélanome</i>
BAGE : <i>B antigens</i>	NK : <i>Natural Killer</i>
BCG : <i>Bacille de Calmette et Guérin</i>	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononucléées du sang périphérique)</i>
CAR : <i>Coxsackie/adenovirus receptor</i>	ROS : <i>Reactive Oxygen Species</i>
CCT : <i>Carcinome à Cellules Transitionnelles</i>	RTUV : <i>Résection Trans-urétrale Vésicale</i>
CD : <i>Cellule Dendritique</i>	TCR : <i>Récepteur à l'antigène des cellules T</i>
CIS : <i>Carcinome In Situ</i>	TCL : <i>Lymphocyte T Cytotoxique</i>
CK : <i>Cytokératine</i>	Th : <i>Lymphocyte T Helper</i>
CMH : <i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>	TIL : <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes (Lymphocytes infiltrant la tumeur)</i>
CPA : <i>Cellules Présentatrices d'Antigène</i>	T-reg : <i>Cellule T régulatrice</i>
CTL : <i>Lymphocyte T Cytotoxique</i>	UP : <i>Uroplakine</i>
EGF : <i>Epidermal Growth Factor</i>	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
FGF : <i>Fibroblasts Growth Factor (Facteur de croissance des fibroblastes)</i>	MAGE : <i>Antigènes du mélanome</i>
GMCSF : <i>Granulocyte - macrophage colony-stimulating factor (facteur de croissance des granulocytes et des macrophages)</i>	NY-ESO-1 : <i>New York Esophageous 1</i>
HLA : <i>Human Leukocyte Antigen</i>	NK : <i>Natural Killer</i>
IL : <i>Interleukine</i>	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononucléées du sang périphérique)</i>

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

- <u>Figure 1</u> : Schéma récapitulatif du déroulement de la réponse immunitaire antitumorale.....	p17
- <u>Figure 2</u> : Bilan des mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire.....	p22
- <u>Figure 3</u> : Représentation schématique des stades pT, selon la classification pTNM.....	p43
- <u>Figure 4</u> : Les tumeurs vésicales, modes de présentation et incidences respectives.....	p44
- <u>Figure 5</u> : Proposition de démarche diagnostique en cas de suspicion d'un carcinome transitionnel de la vessie.....	p103
- <u>Tableau 1</u> : Vue d'ensemble des stratégies vaccinales anticancéreuses.....	p30
- <u>Tableau 2</u> : Classification TNM des tumeurs vésicales.....	p43
- <u>Tableau 3</u> : Comparaison des fréquences des différents stades chez l'homme et le chien.....	p45
- <u>Tableau 4</u> : Tumeurs superficielles de la vessie traitées par résection endoscopique, récurrence et progression (Suivi sur 20 ans).....	p49
- <u>Tableau 5</u> : Temps moyen de survie en fonction du stade TNM de la tumeur chez le chien.....	p52
- <u>Tableau 6</u> : Choix du traitement en fonction du stade TNM chez l'homme.....	p64
- <u>Tableau 7</u> : Tableau récapitulatif des points communs et différences entre le CCT invasif humain et le CCT canin.....	p71
- <u>Tableau 8</u> : Identification des peptides de p53 reconnus par les lymphocytes T CD8 ⁺ de patients atteints de cancers de la vessie (Ferrière <i>et al.</i> , 2001).....	p88

INTRODUCTION

Les cancers de la vessie ont été très étudiés chez l'homme en raison de leur forte prévalence, liée en outre au tabagisme. En France, chaque année, un peu plus de 10 500 nouveaux cas par an sont diagnostiqués, et environ 4500 personnes meurent de leur cancer de la vessie. Une thérapeutique plus efficace est donc clairement nécessaire.

Or de nouvelles cibles thérapeutiques cellulaires et moléculaires ont été identifiées. C'est pourquoi de nombreuses études sont actuellement en cours pour explorer ces nouveaux traitements. Et parmi ceux-ci se trouve l'immunothérapie.

Mais avant d'utiliser un nouvel agent thérapeutique, il est nécessaire d'évaluer non seulement son efficacité et son application clinique potentielle mais aussi son innocuité. Ce qui souligne l'intérêt des modèles animaux.

Dans le cadre de l'immunothérapie appliquée aux cancers de la vessie, les modèles de tumeurs chimio-induites ou greffées sur animaux de laboratoire présentent des limites d'utilisation. En effet ces tumeurs n'étant pas spontanées, elles se développent chez un animal possédant un système immunitaire qui n'est pas celui d'un animal cancéreux. L'idéal est donc de trouver une tumeur vésicale spontanée animale ressemblant suffisamment au cancer de la vessie humain.

Le carcinome à cellules transitionnelles du chien est le seul modèle animal intéressant de cancer de la vessie ; il a déjà été utilisé comme modèle notamment pour tester la toxicité des traitements au Bacille de Calmette-Guérin, et grâce auquel on a découvert un agent thérapeutique qui a ensuite été appliqué à l'homme et qui est le piroxicam.

Cette étude a donc pour objectif de démontrer les similitudes des cancers de la vessie chez l'homme et le chien pour une utilisation prochaine de celui-ci comme modèle d'étude pour des essais d'immunothérapie et plus particulièrement des essais de vaccination antitumorale, à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Ainsi dans une première partie, et pour mieux comprendre l'ensemble de cette étude, nous rappellerons les mécanismes de l'immunité antitumorale et les stratégies élaborées par la tumeur pour y échapper.

Puis nous en déduirons les différentes options thérapeutiques qui en découlent dans le domaine de l'immunothérapie, en mettant en exergue les intérêts de la vaccination antitumorale et les perspectives thérapeutiques qu'elle offre par rapport aux autres techniques.

Ensuite nous comparerons les tumeurs vésicales du chien et de l'homme pour en mettre en évidence les ressemblances et différences, et également pour montrer les limites des traitements actuels.

Nous ferons également le point sur les avancées dans le domaine de l'immunothérapie dans le traitement des cancers de la vessie, pour voir quelles techniques restent encore à explorer, pour y trouver peut être de nouvelles pistes de traitement applicables au chien, mais aussi, et surtout, pour étudier les essais de vaccination antitumorale déjà réalisées chez l'homme.

Enfin nous ferons la synthèse de toutes ces recherches afin d'évaluer le potentiel du chien comme modèle d'étude pour des essais de vaccination antitumorale, et en développant les aspects pratiques de la réalisation tels essais.

1^{ERE} PARTIE : L'IMMUNITE ANTITUMORALE ET SES IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Le système immunitaire est une structure complexe, dont la fonction est de préserver l'intégrité de l'organisme par l'élimination de tout élément n'en faisant pas partie (le « non-soi ») : les cellules, bactéries, parasites, particules, corps étrangers, virus, ou cellules du soi présentant des anomalies, aussi appelées « le soi altéré ». Les organes et tissus lymphoïdes assurent la production, la différenciation et la maturation des cellules lymphoïdes qui sont chargées d'identifier le matériel étranger puis de le neutraliser et l'éliminer.

Le développement d'une tumeur va avoir des répercussions locales voire générales sur un organisme suivant sa nature et sa localisation : cela peut aller d'une simple gêne organique à la mort du sujet. Compte tenu de ces effets délétères, il faut s'interroger sur la manière dont le système immunitaire peut essayer de protéger l'organisme contre l'évolution d'un tel phénomène.

Cette première partie vise à redéfinir les mécanismes de l'immunité antitumorale et les étapes sur lesquelles il est possible d'intervenir en immunothérapie, afin de mieux comprendre l'ensemble de cette étude.

I MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERACTION TUMEUR-SYSTEME IMMUNITAIRE

Pour mettre en évidence cette interaction entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte, il faut pouvoir montrer qu'il existe des rapports ou des contacts entre ces deux éléments. Des données cliniques et histologiques sur l'apparition et l'évolution des processus néoplasiques permettent de confirmer cette réaction de l'hôte.

1 Stabilisation de la croissance des tumeurs et régressions spontanées

Lors de l'examen post-mortem d'un animal âgé, il n'est pas rare de mettre en évidence de façon fortuite la présence de nodules de nature tumorale dans certains organes, nodules qui présentent une taille réduite, et passant cliniquement inaperçus. A partir d'un certain stade la croissance des tumeurs semble donc se stabiliser ; cependant les cellules continuent de se multiplier car dans le cas contraire, la tumeur disparaîtrait. D'après Monnet (2002), Grant (1979) précise que la taille constante de ces tumeurs résulterait d'un équilibre établi entre la multiplication des cellules tumorales et leur lyse par le système immunitaire.

D'autre part, la régression spontanée de certaines tumeurs est possible, bien que très rare. Elle est due à la lyse des cellules tumorales. Or seul le système immunitaire possède des éléments ayant la capacité de détruire ces cellules tumorales. De plus, dans un cas de régression spontanée d'un épithélioma intracutané kératinisant et multicentrique rapporté par Smith *et al.*, l'analyse histologique effectuée sur les deux plus grosses tumeurs avait révélé que le tissu tumoral était infiltré par de nombreuses cellules inflammatoires. Or après l'intervention chirurgicale, beaucoup d'autres lésions ont ensuite régressé spontanément (Monnet, 2002).

2 Mise en évidence d'une réponse immune anti-tumorale au sein de la tumeur

Les examens de nombreuses pièces histologiques provenant de tumeurs d'origines tissulaires variées mettent en évidence la présence de cellules inflammatoires en situation péri ou intra-

tumorale. L'infiltrat cellulaire est constitué de cellules du système lymphoïde, essentiellement des lymphocytes et des macrophages, mais aussi des cellules dendritiques, des granulocytes, et des mastocytes (Monnet, 2002 ; Dangles, 1998).

En fait, autour de la tumeur, s'édifie un tissu conjonctif riche en cellules et dont les remaniements tissulaires, assimilés à un processus inflammatoire, sont qualifiés de stroma-réaction.

Différentes hypothèses sont envisagées. Certains auteurs pensent que la formation du stroma serait consécutive à une réaction inflammatoire induite par le tissu tumoral. En effet la multiplication et la progression des cellules tumorales entraînent la destruction du tissu sain environnant : la lyse cellulaire provoque la sécrétion d'enzymes et des protéases responsables de la réaction inflammatoire. D'autres auteurs affirment que la stroma-réaction est le témoin d'un combat du système immunitaire contre la tumeur (Monnet, 2002).

Dans le cas de carcinomes mammaires, de mélanomes et de tumeurs de la vessie, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la présence d'infiltrats lymphoïdes et un pronostic favorable (Costello *et al.*, 1999).

3 Le concept d'immunosurveillance

Le système immunitaire est chargé d'identifier tout matériel étranger à l'organisme. Les cellules tumorales sont issues, à l'origine, du soi. Comment le système immunitaire est-il alors capable de les identifier ?

En réalité la cellule tumorale est considérée comme une cellule du non-soi : c'est une cellule du soi qui a subi une modification de son génome. Cette mutation peut être spontanée ou provoquée par un agent chimique, physique, ou un virus oncogène.

Les lésions du génome vont provoquer des modifications irréversibles qui vont se transmettre aux cellules filles. La cellule tumorale se différencie alors des cellules du soi par son fonctionnement, ses nouvelles propriétés, et la synthèse de protéines différentes qui fait que les antigènes du soi disparaissent pour laisser place aux antigènes tumoraux. Par ailleurs la cellule acquiert une capacité fonctionnelle spécifique : la perte de facteurs de régulation et de multiplication, qui se traduit par une croissance illimitée et autonome (Monnet, 2002).

La cellule tumorale étant donc différente du soi, il est alors possible pour le système immunitaire de la repérer.

C'est en 1970 que Burnet a émis le concept d'immunosurveillance. Cette théorie repose sur le fait que le système immunitaire surveille en permanence le bon fonctionnement de l'organisme, il repère, détecte la moindre anomalie et applique les mesures adéquates pour l'anéantir. On sait en outre que la transformation maligne s'accompagne de l'expression de néo-antigènes ou de la réexpression d'antigènes ayant disparu. Ainsi, la plupart du temps, ces antigènes seront reconnus par le système immunitaire de l'hôte et les cellules seront éliminées (Dangles, 1998).

Cependant, il arrive que parfois ces cellules échappent à cette surveillance et se développent sous forme d'une tumeur.

→ Une fois les antigènes identifiés, on peut envisager qu'une stimulation efficace du système immunitaire pourrait conduire à des réponses thérapeutiques anti-tumorales : régression des tumeurs voire prévention d'apparition de cancers.

II LES DIFFERENTS MECANISMES IMPLIQUES

1 Immunité innée

L'immunité innée englobe un grand nombre de populations cellulaires différentes telles que les monocytes, les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les cellules dendritiques, les leucocytes polynucléaires et des sous-populations variées de lymphocytes qui relient l'immunité innée à l'immunité acquise.

L'immunité innée constitue un système de défense efficace et immédiat car elle ne nécessite pas l'expansion clonale de lymphocytes spécifiques d'un antigène, et codent pour des récepteurs qui ne nécessitent pas de réarrangement somatiques.

Ces composants de l'immunité innée vont avoir deux rôles :

- constituer une première ligne de défense,
- activer la réponse immunitaire acquise.

1.1 Les cellules phagocytaires : macrophages et neutrophiles

Les phagocytes sont des cellules effectrices majeures dans la réponse immunitaire non spécifique. Ils vont intervenir dans la phase initiale de la réponse immunitaire. Ces cellules regroupent, d'une part, les lignées monocytaires : les monocytes – macrophages, et d'autre part, les lignées granulocytaires : les polynucléaires.

Cependant nous verrons que les macrophages et les neutrophiles peuvent être considérés à la fois comme des systèmes de protection, mais aussi comme des dangers dans un contexte de développement tumoral (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

1.1.1 Les macrophages

Concernant les macrophages, leur activation dépend de leur état de différenciation et de maturation, ainsi que de facteurs extérieurs : cytokines et stimuli inflammatoires. Les macrophages présents *in situ* peuvent être activés par plusieurs interleukines dont l'IFN γ , l'IL-4, le Tumor Necrosis Factor (TNF) ou encore le Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Ces lymphokines sont sécrétées par les lymphocytes T activés.

Ils possèdent un pouvoir de phagocytose des cellules tumorales. Ils vont reconnaître les cellules du non-soi, y adhérer, puis les engloutir en partie ou en totalité. Ils possèdent un récepteur complémentaire du fragment Fc des immunoglobulines, qui participe au phénomène appelé Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity (ADCC) (Jak'obisiak *et al.*, 2003). Les macrophages adhèrent à la membrane de la cellule tumorale grâce à l'immunoglobuline et la phagocytose est facilitée. Les lysosomes des macrophages déchargent alors des enzymes destinées à détruire ou à transformer le matériel étranger. Les antigènes tumoraux sont dégradés en petits peptides, puis associés aux molécules du CMH. Cela fait des macrophages des cellules présentatrices d'antigène. Ce phénomène est favorable à la stimulation des lymphocytes. Les produits dégradés sont ensuite déversés dans le milieu extracellulaire par exocytose, et sont alors susceptibles de stimuler et de recruter des cellules effectrices.

Le pouvoir lytique des macrophages est médié par différents mécanismes : le relargage de cytokines cytotoxiques comme l'IL-1 ou le TNF, la production de radicaux libres, la sécrétion de protéases, la formation de nitrites (qui inactivent des enzymes ayant un rôle majeur dans le métabolisme).

Il faut surtout retenir que les macrophages sont à la fois des cellules effectrices mais aussi des cellules présentatrices d'antigènes.

1.1.2 Les polynucléaires

Parmi les trois familles de polynucléaires, seuls les neutrophiles et les éosinophiles sont mis en évidence sur le site d'une réaction immunologique antitumorale. Ce sont les neutrophiles qui prédominent largement. Les tumeurs peuvent aussi être infiltrées par des éosinophiles, qui libèrent des peroxydases et la protéine basique majeure, de puissantes cytokines utilisées dans l'élimination des parasites mais endommageant aussi les tissus normaux. Bien que les infiltrats éosinophiliques soient relativement peu fréquents, leur présence est corrélée à un meilleur pronostic (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

Les polynucléaires phagocytent de manière non spécifique les cellules tumorales et les corps apoptotiques qui résultent de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ et des macrophages. Leur recrutement sur le site tumoral est induit soit par la sécrétion de substances chimiotactiques et de médiateurs vasoactifs de l'inflammation, soit par une infection microbienne du tissu. Comparé à celle des macrophages, la présence des polynucléaires résulte plus de leur rôle de « nettoyage » et de leur pouvoir bactéricide plutôt que d'une véritable action antitumorale. La destruction des polynucléaires provoque la libération d'enzymes lytiques, contenues dans leurs granulations, ce qui amplifie la réaction immunitaire (McEwen et Helfand, 1996).

1.1.3 Un rôle cependant controversé

Il a été démontré que les neutrophiles et macrophages activés pouvaient induire une transformation des cellules normales *in vitro*. De plus, des études épidémiologiques ont pu établir un lien étroit entre inflammation chronique et incidence d'apparition de tumeurs (Jak'obisiak *et al.*, 2003) (Pour plus de détails, voir dans la partie : 3.2 Inflammation et cancer).

Ainsi il n'y a pas de preuves convaincantes permettant d'affirmer que les macrophages ou les neutrophiles joueraient un rôle significatif dans l'immunosurveillance antitumorale.

Cependant ces effecteurs tuent les cellules et les polypeptides (ou protéines) dérivés des cellules tumorales et qui sont libérés au cours de ce processus, subissent une endocytose par les cellules dendritiques (qui constituent les cellules présentatrices d'antigène professionnelles de l'organisme). Ces cellules forment donc le lien entre la réponse immune innée, et le système immunitaire acquis

1.2 **Le complément**

De nombreuses études ont mis en évidence une activation suivie d'une fixation des composants du complément au niveau de la tumeur. Pourtant le rôle du complément dans la surveillance immunitaire anticancéreuse n'a pas été unanimement démontré. Ce sont les anticorps liés à la tumeur qui induisent en général son activation dans le contexte d'une réponse anti-tumorale. Ainsi ce système ne serait donc efficace qu'en présence d'une réponse immunitaire à médiation humorale.

Malgré les nombreuses observations démontrant que les cellules tumorales sont protégées du complément par des inhibiteurs de surface tels que CD35, CD46, CD55, il n'y a aucune preuve que ces mécanismes protecteurs ont une importance quelconque dans la progression tumorale. Tous ces mécanismes protecteurs sont aussi employés par les cellules nucléées normales pour se protéger contre une activation spontanée du complément.

Apparemment, les mécanismes de la résistance au complément pourraient avoir une importance pour la thérapeutique, car ils protégeraient la tumeur contre l'activation du complément induite par les anticorps monoclonaux utilisés dans un but thérapeutique (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

1.3 Les cellules Natural Killer

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux capables de lyser spontanément certaines cellules tumorales et/ou infectées sans stimulation antigénique préalable.

Dans la plupart des cas, les cellules NK tuent spécifiquement les cellules ayant une expression diminuée de molécules du CMH. Les cellules NK possèdent en effet des récepteurs aux molécules du CMH de classe I qui inhibent son activité. Or la sous-expression antigénique est un mécanisme relativement simple pour échapper à une réponse immune spécifique, surtout pour des cellules tumorales génétiquement instables, ce qui explique l'importance de l'action des cellules NK (Jakóbiak *et al.*, 2003). De plus, comme elles abondent dans les vaisseaux sanguins, elles préviennent et limitent la dissémination métastatique.

Cependant d'après de récentes observations, les cellules NK seraient aussi capables de tuer des cellules exprimant pourtant en quantité suffisante les molécules du CMH à leur surface. Cela impliquerait que l'activation des NK ne serait pas seulement le résultat d'une sous-expression des molécules du CMH mais résulterait également de la reconnaissance de structures cellulaires cibles. Des récepteurs d'activation ou de déclenchement présents sur les cellules NK ainsi que leurs ligands sur les cellules cibles ont permis d'élucider de nombreuses questions soulevées par le contrôle de l'activité NK. Il apparaîtrait à l'heure actuelle que les cellules NK auraient évolué non seulement pour coopérer avec l'immunité acquise (sécrétion de cytokines régulant la fonction T, expression de CD6...), mais ils contiendraient également un arsenal thérapeutique complet pour la détection et l'élimination de cellules potentiellement « dangereuses ».

➤ Mécanismes de la lyse NK :

L'activation des cellules NK résulte de l'action concertée de récepteurs activateurs et inhibiteurs, ainsi que des cytokines, de molécules d'adhésion et de co-stimulation. Les récepteurs activateurs peuvent initier l'activation des cellules NK et orienter vers la lyse cellulaire, à condition que les cellules NK ne soient pas désactivées par les récepteurs inhibiteurs (Jakóbiak *et al.*, 2003).

D'après Yokoyama, chez l'homme, le récepteur NKR-P1, exprimé sur toutes les cellules NK, active ces cellules suite à la reconnaissance de groupements carbohydrates de certaines glycoprotéines. Cette propriété présente un intérêt dans l'élimination des cellules tumorales qui sont souvent le siège d'anomalies de la glycosylation (Dangles, 1998).

Les KIR (Killer Cell Inhibitory Receptor) définissent le 2^{ème} type de récepteurs présents sur les cellules NK humaines. Ils appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comportent des motifs conservés de phosphorylation de tyrosine dans leur partie intracytoplasmique. Ce domaine intracellulaire leur permet de recruter une tyrosine phosphatase, SHP-1, dont le rôle dans l'inhibition de l'activité des cellules NK médié par KIR a été démontré. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement certains allotypes HLA-A (Human Leucocyte Antigen A), HLA-B ou HLA-C et délivrent un signal contrecarrant celui émis par les NKR-P (Burshtyn *et al.*, 1996).

La lyse des cellules tumorales par les cellules NK est due à l'action de perforines libérées dans des granules mais également à un processus apoptotique. L'activation NK se traduit par la sécrétion de nombreuses cytokines (IFN γ , GM-CSF, des membres de la famille du TNF) et est stimulée par différentes cytokines.

Parmi les cellules tueuses on trouve un groupe particulier : les cellules LAK (Lymphocytes Activated Killer : activité tueuse stimulée par les lymphocytes). Ce sont à l'origine des cellules tueuses : NK ou K, ainsi que les cellules T CD8+, cultivées *in vitro* et stimulées par l'IL-2. La stimulation par l'IL-2 accroît la fonction cytotoxique de ces cellules et prolonge leur action (Jardine *et al.*, 1989).

→ Les cellules phagocytaires (monocytes-macrophages et polynucléaires) ainsi que les cellules « killer » détruisent spontanément les cellules tumorales et jouent donc un rôle non négligeable dans l'immunité antitumorale.

2 L'immunité acquise

2.1 Réponse immune à médiation humorale

Celle-ci joue un rôle mineur dans l'immunité anti-tumorale. Ses effecteurs sont les cellules B, qui ciblent des antigènes extracellulaires avec les anticorps. Les anticorps sont appelés immunoglobulines ; ce sont des récepteurs de surface sur les cellules B ou des protéines libres dans le plasma après activation des cellules B. Les anticorps agissent selon trois mécanismes :

- (a) la neutralisation prévient la liaison des pathogènes à la surface cellulaire et l'infection cellulaire,
- (b) l'opsonisation, qui facilite la phagocytose ou l'ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity),
- (c) l'activation du complément.

Dans le cadre de l'immunité anti-tumorale, l'action des cellules B se limite surtout à l'ADCC (Broghammer et Ratliff, 2002).

2.2 Réponse immune à médiation cellulaire

La réponse immunitaire à médiation cellulaire joue un rôle crucial dans l'immunité antitumorale dans les tumeurs solides.

Cette affirmation repose essentiellement sur (Huber et Wölfel, 2004) :

- l'observation d'une fréquence plus élevée des tumeurs lors de syndromes d'immunodéficience cellulaire acquise ou congénitale,
- l'identification d'antigènes tumoraux reconnus par des cellules T cytotoxiques,
- la constatation d'une corrélation positive entre l'étendue de l'infiltration tumorale par les lymphocytes T et le pronostic.

➤ Mécanisme général : (Voir figure 1 page 17)

L'immunité acquise constitue un mécanisme selon lequel des mutations survenant dans deux populations spécialisées (les lymphocytes T et B) produisent un grand nombre de modèles moléculaires différents, qui sont exprimés en tant qu'anticorps ou récepteurs sur les cellules T.

Si ces molécules se lient à des protéines structurellement similaires, il se produit une prolifération des lymphocytes spécifiques de l'antigène et une réponse immune spécifique est alors générée. La spécificité de la réponse immune réside ainsi dans la sélection de la prolifération clonale des lymphocytes.

Deux autres familles de molécules jouent un rôle majeur dans l'immunité acquise : le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et les cytokines. Ils constituent un lien essentiel pour la communication inter-cellulaire et représentent un composant de la réponse immunitaire acquise (ainsi que de l'innée). La protéine de surface CD40 avec son récepteur, fournit un signal de co-stimulation pour l'interaction entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Adam *et al.*, 2003).

On peut distinguer 2 étapes :

- une 1^{ère} phase de reconnaissance, qui va faire intervenir les CPA (cellules dendritiques et macrophages), qui vont effectuer la présentation antigénique par l'intermédiaire des molécules

du CMH de classe II aux lymphocytes T CD4 (Costello *et al.*, 1999). La présentation antigénique nécessite qu'au préalable les antigènes tumoraux aient subi une phagocytose ou endocytose, puis une dégradation enzymatique au sein de la CPA (Broghammer et Ratliff, 2002).

- une 2^{ème} phase dite effectrice qui correspond à la reconnaissance par les lymphocytes T CD8 d'antigènes tumoraux associés aux molécules du CMH de classe I sur les cellules tumorales (Costello *et al.*, 1999).

Les cellules dendritiques vont internaliser les peptides issus de la dégradation des antigènes tumoraux. Elles vont ensuite présenter à leur surface ces antigènes, associés aux molécules du CMH, à la fois aux lymphocytes T helper de type 1 et aux cellules T cytotoxiques (Schenk-Braat et Bangma, 2005). Pour cela elles vont devoir, après phagocytose et dégradation enzymatique des antigènes tumoraux, migrer au niveau des tissus lymphoïdes afin de pouvoir présenter les peptides tumoraux aux cellules T (Broghammer et Ratliff, 2002).

Les cellules T matures vont exprimer à leur surface des récepteurs. Les Th1 présentent le récepteur CD4, et reconnaissent les antigènes associés aux CMH de classe II. Les cellules T cytotoxiques, présentent le récepteur CD8, et reconnaissent les antigènes associés aux CMH de classe I (Broghammer et Ratliff, 2002).

Il est indispensable que les cellules Th1 soient activées à ce stade initial de la réponse immune spécifique, car ce sont ces cellules qui orientent la cascade de réactions vers une réponse à médiation cellulaire en stimulant et en aidant les cellules T cytotoxiques par libération de cytokines. (Au contraire l'activation des Th2 orienterait une réponse immune à médiation humorale (RIMH)). Les sous-populations de cellules T cytotoxiques reconnaissant les peptides de l'antigène tumoral présenté, vont se développer et migrer jusqu'à la tumeur de façon à tuer spécifiquement les cellules tumorales présentant l'antigène (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Il est important de préciser que l'activation des cellules T requiert non seulement le 1^{er} signal produit par la liaison du récepteur de la cellule T à un complexe antigène/CMH, mais aussi un second signal, qui correspond à une interaction non spécifique entre une autre molécule de surface sur les cellules T et le ligand approprié sur la cellule présentatrice d'antigène. L'absence de ce second signal, appelé signal de co-stimulation, aboutira à l'anergie, la tolérance envers l'antigène, et l'absence d'activation du système immunitaire (Broghammer et Ratliff, 2002, Costello *et al.*, 1999).

Enfin, la réponse immune spécifique va également générer des cellules T mémoires qui peuvent protéger l'hôte contre une récurrence de la tumeur ou des métastases.

A chacune des deux étapes citées précédemment, existent des possibilités de dysfonctionnement pouvant aboutir à l'échappement tumoral (Costello *et al.*, 1999).

3 Mécanismes intervenant à la fois dans les immunités innées et acquises

3.1 Rôle des cytokines dans l'immunosurveillance

Les systèmes immunitaires acquis et innés sont étroitement régulés et liés par des cytokines et des chimiokines produites par diverses cellules immunitaires. Elles sont indispensables à la lutte antitumorale et jouent un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire.

L'ensemble des médiateurs jouant un rôle dans la réponse immunitaire sont appelés les cytokines. Elles sont désignées soit par le mot « interleukine », suivi d'un numéro qui correspond au stade de leur découverte (il y en a treize recensées actuellement), soit par leur mode de fonctionnement.

Les cytokines ont un rôle comparable à des hormones qui assurent une communication chimique entre les cellules. Cependant, contrairement aux hormones, les cytokines ont une action limitée dans l'espace.

La formation des cytokines, leur libération et leurs interactions avec les cibles, constituent une arme importante des cellules en réponse à la croissance, la réparation et la prolifération cellulaire. D'après Adam *et al.* (2003), les cytokines les plus importantes dans la modulation de la prolifération des cellules tumorales sont probablement la famille des Transforming growth factor – β (TGF- β), l'Epidermal growth factor (EGF), et les facteurs de croissance hématopoïétique.

Nous n'évoquerons ici que les cytokines présentant un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire antitumorale:

L'interleukine-1: C'est principalement un médiateur de l'inflammation, responsable de la fièvre et de l'activation des cellules inflammatoires. Son intérêt est qu'elle agit précocement, et va déclencher la production d'autres cytokines. Elle est sécrétée par les macrophages. Bien qu'elle ait un rôle clé dans l'amplification des réactions immunitaires, ses implications dans l'inflammation limitent son intérêt en immunothérapie.

Le Tumor Necrosis Factor (TNF α): Comme son nom l'indique, c'est un agent tumoricide. Son activité est modulée par d'autres cytokines. Le TNF α stimule la sécrétion d'IL-1 et de PGE-2, deux médiateurs à l'origine des poussées de fièvre. Le TNF α est un facteur pro-inflammatoire puissant. Son utilisation à des fins thérapeutiques s'est révélée décevante, d'autant qu'il provoque des effets secondaires difficiles à supporter pour le patient.

L'Interféron (IFN): Celui qui intervient dans la lutte antitumorale est l'IFN γ . Il stimule la cytotoxicité des cellules immunitaires. Il module aussi l'expression des récepteurs de surface tels que les antigènes du CMH de classes I et II (favorables au recrutement des lymphocytes T) et tels que les récepteurs pour le TNF (qui présente une forte activité contre les tumeurs). L'inconvénient des interférons est qu'ils n'agissent que sur les cellules d'une même espèce, rendant son utilisation plus contraignante car elle implique d'utiliser la molécule de l'espèce homologue.

L'Interleukine-2 : Elle est sécrétée par les lymphocytes T auxiliaires et les macrophages activés. Elle a un rôle régulateur du système immunitaire : elle entraîne la multiplication et la différenciation des lymphocytes T. D'une part, elle stimule l'action des cellules tueuses (NK et LAK). D'autre part, elle induit la synthèse d'IL-1, d'IFN γ , d'IL-6, de TNF, et de GM-CSF et agit en synergie avec des cytokines comme l'IFN γ . En outre, l'IL-2 module sa propre activité : elle augmente sa production et sa force d'action par l'apparition préférentielle de récepteurs à IL-2 sur les cellules activées.

L'IL-2 est très peu spécifique d'espèce, ce qui a des conséquences pratiques intéressantes. La synthèse d'IL-2 humaine est par ailleurs déjà maîtrisée par génie génétique. Sa durée d'action est courte, mais elle peut être prolongée par des administrations par voie sous-cutanée ou intramusculaire (la résorption est plus lente). Il n'est pas envisageable d'augmenter les doses, car à forte dose, l'IL-2 se révèle toxique.

3.2 Les IKDC : Interféron-producing killer dendritic cells

Une nouvelle population cellulaire a récemment été mise en évidence par Chaput *et al.* (2006). Ces nouvelles cellules, nommées IKDC (Interféron-producing killer dendritic cells), ont la particularité de co-exprimer les marqueurs de cellules NK et de CD.

Il a été démontré que les IKDC étaient capables de tuer spontanément des cellules tumorales *in vitro* par un mécanisme dépendant du TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). L'expression de TRAIL à la surface de ces cellules est contrôlée par l'IFN type II. Or Chaput *et al.* ont démontré

que les IKDC devenaient capables de sécréter des quantités importantes d'IFN γ en présence de cellules tumorales, et ce de façon beaucoup plus importante que les cellules NK.

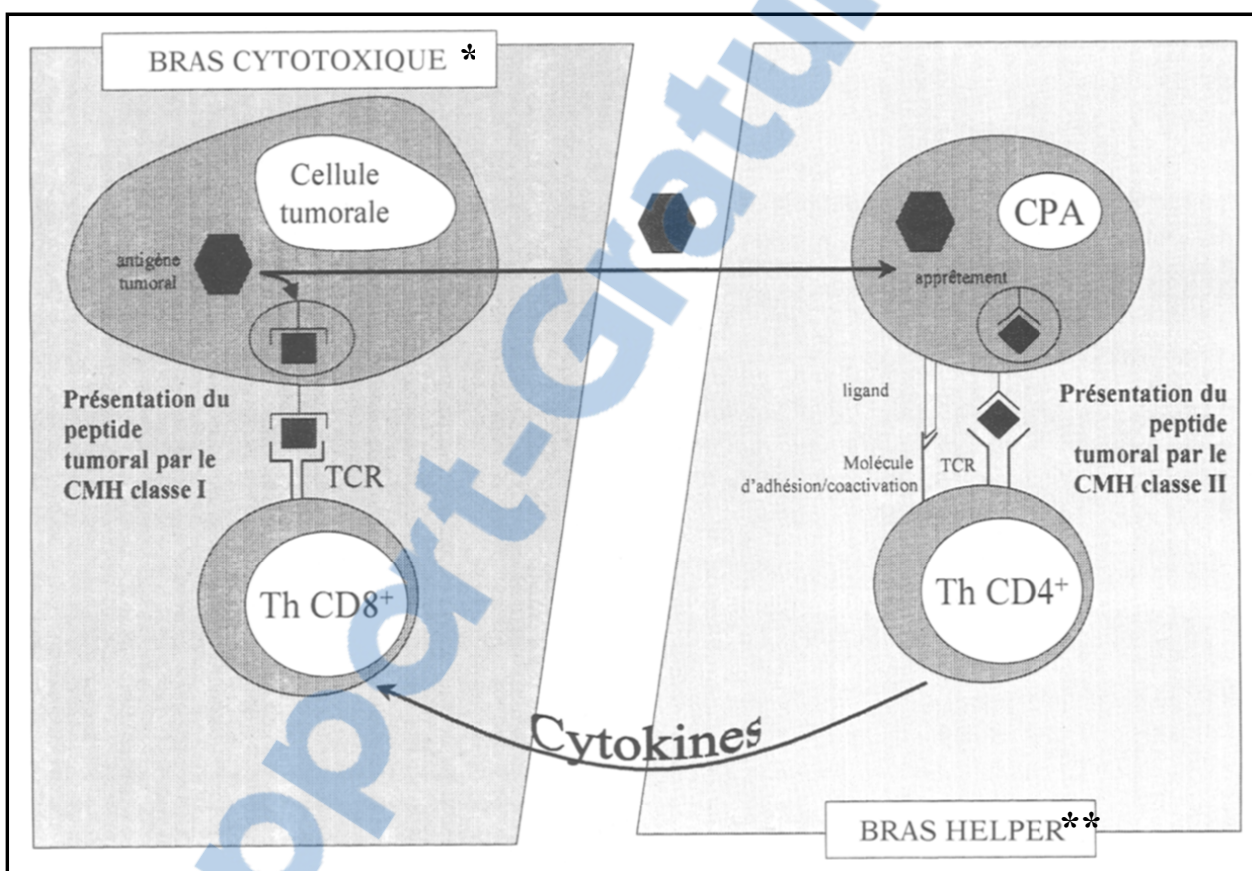
Il a aussi été mis en évidence que les IKDC étaient capables d'apprêter un antigène et de le présenter aux lymphocytes T CD4+.

Du fait de ces deux propriétés, les IKDC peuvent ainsi être considérées comme des CD essentielles permettant de relier les immunités innées et acquises (Chaput *et al.*, 2006).

4 Bilan : induction d'une réponse immune de rejet tumoral

Voici un schéma récapitulatif permettant d'avoir une vision globale de la réponse immunitaire antitumorale.

Figure 1: Schéma récapitulatif du déroulement de la réponse immunitaire antitumorale (Source : Bernard et Kochman, 1997)



***Bras cytotoxique :** Les antigènes synthétisés par la cellule tumorale sont lysés dans le milieu intracellulaire et présentés au niveau membranaire sous forme de peptides par les molécules du CMH classe I. Le complexe est reconnu par le récepteur d'antigène (TCR) du lymphocyte T cytotoxique (Tc). Ce premier signal d'activation est modulé par des signaux de coactivation de nature paracrine présents dans le microenvironnement et sécrétés par des lymphocytes assurant la fonction « helper », (Th). En réponse à l'ensemble de ces signaux, les lymphocytes Tc prolifèrent plus ou moins, sécrètent des cytokines et se différencient en cellules tueuses capables de lyser spécifiquement toute cellule cible exprimant les antigènes tumoraux.

****Bras helper :** des antigènes tumoraux libérés par la cellule tumorale sont internalisés par des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (CPA). L'antigène apprêté par ces cellules est présenté aux lymphocytes Th en association avec des molécules de classe II du CMH. Le signal antigénique est délivré aux lymphocytes Th lors de la reconnaissance de ce complexe par leur TCR. L'activation des lymphocytes Th par ce premier signal est modulée par divers signaux de

coactivation délivrés par le microenvironnement paracrine. Ces ligands de coactivation sont des cytokines présentes dans le milieu et des molécules exprimées par la CPA ; ils sont reconnus par les récepteurs membranaires correspondant des lymphocytes Th. En réponse à l'ensemble de ces signaux les lymphocytes Th vont plus ou moins proliférer et sécréter des cytokines en quantité et qualité variable.

III ÉCHAPPEMENT DES CANCERS AU SYSTEME IMMUNITAIRE

Il est évident qu'un système immunitaire compétant est nécessaire pour le contrôle des processus tumoraux et que l'immunosuppression associée au cancer contribue à sa progression.

Mais les tumeurs ont, en plus de cela, développé des stratégies pour échapper avec succès au système immunitaire de l'hôte, et divers mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de ce phénomène ont été identifiés (Whiteside, 2006). La *figure 2* page 22 fait le bilan de tous les mécanismes favorisant l'échappement tumoral, que nous allons détailler dans cette partie.

Un certain nombre de ces mécanismes ont pour cible les cellules effectrices de l'immunité antitumorale. Le dysfonctionnement et l'apoptose des cellules immunitaires des patients cancéreux créent un déséquilibre immunitaire qui ne peut pas être corrigé par des méthodes d'immunothérapie visant seulement à activer la réponse immune anti-tumorale.

La correction des dysfonctions immunitaires existantes et la normalisation de l'homéostasie lymphocytaire chez les patients cancéreux, fait partie des objectifs futurs de l'immunothérapie. Les stratégies thérapeutiques visent à corriger ce déséquilibre immunitaire, fournir une stimulation adéquate *in vivo*, transférer des lymphocytes T effecteurs capables d'expansion *in vivo* et capables d'apporter une protection à l'hôte. La survie de ces cellules et le développement d'une mémoire à long terme chez les patients cancéreux sont nécessaires pour améliorer les bénéfices cliniques de l'immunothérapie (Whiteside, 2006).

1 Compétence immunitaire et cancer

Il existe peu de preuves convaincantes permettant d'établir un lien direct entre le développement du cancer et une diminution de compétence immunitaire chez les personnes qui succombent du cancer. Cependant on pense que l'immunité innée pourrait être déficitaire chez ces patients. En effet les personnes âgées, les personnes sous médicaments immunosuppresseurs, ou qui présentent une anomalie de leur système immunitaire, sont des sujets à risque pour le cancer. Et parmi les principaux facteurs de risque pour le cancer on trouve aussi : l'âge, la malnutrition, le stress, le tabagisme, et l'alcoolisme, auxquels il faut ajouter les prédispositions génétiques et les infections virales associées au développement de cancers spécifiques (Epstein Barr, Hépatite, HIV, infection à l'herpes virus) (Whiteside, 2006 ; Costello *et al.*, 1999).

Quelques observations permettent d'étayer l'hypothèse selon laquelle une diminution de la compétence immunitaire serait un facteur de risque de développer un cancer : par exemple une faible activité Natural Killer a été reportée dans les cancers mammaires familiaux. Cependant ce ne sont que des reports anecdotiques qui n'ont pas encore été acceptés comme preuve d'un déficit immunitaire. Dans les études effectuées sur des modèles animaux, on a tout de même pu mettre en évidence le fait que les immunités innée et acquise sont importantes et nécessaires à la prévention du cancer.

2 Les Mécanismes d'échappement élaborés par la tumeur

2.1 Pouvoir immunogène faible des tumeurs et détournement de la réponse immunitaire

Les antigènes des tumeurs possèdent un faible pouvoir immunogène, c'est-à-dire qu'ils suscitent peu l'activation des cellules immunocompétentes. La faiblesse du pouvoir immunogène est corrélée aux caractéristiques des antigènes associés aux tumeurs spontanées (Monnet, 2002).

Certaines tumeurs spontanées ne possèdent pas suffisamment d'antigènes extra cellulaires. D'autre part, on sait que les antigènes tumoraux sont, pour l'essentiel, des antigènes du soi. La tolérance au soi, même au « soi-modifié », va empêcher la survenue d'une réponse immunitaire efficace lors de l'apparition de la tumeur. L'absence d'un fort signal de danger contribue en effet à la capacité des tumeurs nouvellement formées à échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (Whiteside, 2006).

L'échappement résulte donc à la fois d'une faible stimulation des cellules T et aussi du fait que les cellules tumorales ne procurent que peu de cibles pour les lymphocytes T spécifiques de la tumeur : (Whiteside, 2006 ; Broghammer et Ratliff, 2002)

- sous expression des molécules de classe I,
- sous-expression des antigènes tumoraux,
- variabilité des antigènes de surface (mutation d'une cellule et apparition de nouveaux clones, ce qui nécessite une adaptation du système immunitaire),
- sous expression des molécules de co-stimulation (qui sont nécessaires à l'interaction avec les lymphocytes T cytotoxiques) ainsi que des molécules d'adhésion.

De plus, certaines tumeurs ont la capacité de sécréter des antigènes tumoraux dans le milieu circulant, spontanément ou à la suite d'une lyse tumorale. Cela stimule les cellules immunitaires qui les rencontrent, et entraîne une cascade de réactions avec formation d'immuns complexes (complexes antigène/anti-corps) capables d'activer le complément. Cela épuise en vain les cellules immunitaires car il n'y a pas de cellules à détruire, et l'attaque cytotoxique du complément a lieu à distance de la tumeur (D'après Levy JP, dans Monnet, 2000).

Enfin selon la composition du tissu conjonctif entourant la tumeur (le stroma), celui-ci va participer plus ou moins au camouflage de la tumeur. Ainsi, le stroma, constitué d'un assemblage de fibres de collagène, forme un tissu fibro-hyperplasique qui va engainer la tumeur dans une coque fibreuse et lui permettre, en bloquant les cellules immunitaires en périphérie du tissu tumoral, d'échapper à celles-ci (Magnol et Apache, 1983).

2.2 Altérer le fonctionnement du système immunitaire

Les tumeurs vont interférer directement avec le système immunitaire, et ce par deux moyens : elles vont libérer des facteurs qui modulent la fonction immunitaire (modulation de la réponse ou orientation vers l'induction de cellules T suppressives), ou vont induire l'apoptose des cellules immunitaires (Whiteside, 2006 ; Broghammer et Ratliff, 2002).

Ainsi la cellule cancéreuse peut détruire ou inactiver les cellules effectrices par la sécrétion de molécules solubles (cytokines ou formes solubles de récepteurs) : notamment TGF β et IL-10, mais aussi ROS, enzymes, et ligands inhibiteurs tels que FasL ou TRAIL. Ces substances peuvent être libérées par la tumeur elle-même ou par les cellules du tissu environnant. Un des systèmes illustrant le mieux ce phénomène est celui de Fas/FasL. Brièvement, la molécule Fas, lorsqu'elle est stimulée par son ligand FasL, induit un message de mort cellulaire activée qualifié d'apoptose. La molécule Fas est exprimée sur de nombreuses cellules y compris les lymphocytes T. L'expression d'un FasL fonctionnel a été démontrée sur les cellules tumorales de carcinome colique, d'hépatome,

de mélanome ou de lymphome. De ce fait, les lymphocytes infiltrant la tumeur sont détruits par apoptose, alors que la tumeur elle-même est souvent au moins partiellement résistante à la voie d'apoptose Fas-dépendante (Costello *et al.*, 1999, Whiteside, 2006).

D'après Whiteside (2002) des microvésicules supposées dérivées des cellules tumorales et contenant une forme membranaire biologiquement active de FasL, seraient présentes dans le sérum des patients cancéreux, notamment les patients atteints de cancers de la tête et du cou, de carcinomes ovariens, et de mélanomes. Ces structures seraient capables d'induire l'apoptose des lymphocytes Fas+ à distance du site de la tumeur.

Les effets immunosuppresseurs induits par la tumeur sont visibles localement : par exemple parmi les TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes), on trouve essentiellement des LT mémoire. Par comparaison avec la population de lymphocytes circulants (PBM : Peripheric Blood Monocytes) ou de lymphocytes mis en évidence dans des tissus à distance de la tumeur, les TIL se sont révélés peu ou pas réactifs aux stimuli traditionnels. Ils sont capables de sécréter des cytokines, mais le profil de synthèse est anormal par rapport aux cellules T normales : ils sont incapables de produire de l'IL-2 et n'expriment plus le récepteur à l'IL-2 (Lopez *et al.*, 1998). De plus un déséquilibre dans les cytokines produites localement a été émis en évidence : une pauvreté en cytokines orientant vers une voie Th1 (IL-2, IFN- γ , et IL-12) et l'augmentation des cytokines T-reg (cellules T régulatrices) va orienter préférentiellement les lymphocytes T vers une voie Th2 moins efficace, ou vers un phénotype fonctionnel T-reg (chez un patient normal, on devrait trouver une population mixte type 1/type 2) (Whiteside, 2006).

Au niveau systémique on rencontre aussi des altérations des cellules T spécifiques des antigènes tumoraux et des cellules NK : celles-ci montrent une diminution de l'expression de la chaîne ζ du groupement CD3 et une diminution de la réponse aux antigènes *in vitro*, chez les patients cancéreux. En outre on a constaté que les lymphocytes T circulant avaient une sécrétion de cytokines modifiée ou une fonction altérée chez les cancéreux. Ainsi l'expression de la chaîne ζ de CD3 peut être un marqueur d'immunocompétence et les patients qui l'exprimeraient seraient plus susceptibles de répondre au traitement mis en place (Whiteside, 2006).

3 Les défaillances du système immunitaires compétent

3.1 Les Lymphocytes T régulateurs

Il est aussi logique d'impliquer dans cette défaillance de système immunitaire, les systèmes régulateurs des réactions immunologiques tels que les lymphocytes T suppresseurs. Dans les années 70, on a constaté que ces cellules T suppressives, aujourd'hui connues sous le nom de cellules T régulatrices (T-reg), avaient un impact sur la progression du cancer dans les modèles tumoraux expérimentaux. Ils auraient un effet suppresseur de l'immunité antitumorale, qui serait spécifique de la tumeur, ainsi qu'un effet suppresseur de l'immunité dirigée contre les antigènes du soi. De plus il a été démontré que ces lymphocytes T-reg s'accumulaient au sein des tumeurs en croissance. Suite à cette découverte, de nombreuses études ont été lancées ; les marqueurs cellulaires ont alors été identifiés, et les cellules T CD4+ CD25+ ont été référencées comme les cellules T-reg naturelles (Orentas *et al.*, 2006).

L'identification de ces T-reg a permis d'expliquer pourquoi une tumeur très immunogène pouvait progresser malgré l'existence concomitante d'une immunité dirigée à son encontre. Des chercheurs ont même démontré que le cyclophosphamide pouvait augmenter la réponse immunitaire dirigée contre les tumeurs expérimentales, en ciblant apparemment la population de cellules suppressives. Dans certains modèles expérimentaux, il a même été possible d'induire le rejet de tumeur en associant un traitement au cyclophosphamide suivi de l'administration de cellules T ayant été préalablement sensibilisées aux cellules tumorales.

Les T-reg exercent un effet suppresseur à la fois contre l'immunité acquise et l'immunité innée. Ils inhibent la création et l'expansion d'une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre la tumeur, résultant en une diminution des lymphocytes B et T réactifs à la tumeur. Les T-reg sont capables de supprimer la prolifération des cellules T CD4+ et des T CD8+ par simple contact, et de façon non « antigène-spécifique ». La suppression de la prolifération des CD4+ serait médiée par une inhibition de la sécrétion d'IL-2., qui affecterait également la prolifération des cellules CD8+.

Les T-reg pourraient aussi inhiber l'immunité antitumorale en empêchant la création d'un répertoire de cellules T effectrices ayant une forte avidité vis-à-vis de la tumeur. De même ils agissent sur le répertoire de cellules B en empêchant la stimulation des cellules B anergiques dirigées contre le soi par les LT auxiliaires, et en ayant la capacité de lyser les cellules B présentant leur AG par une molécule du CMH de classe II.

De plus ils ont la capacité d'affecter les fonctions des cellules immunitaires effectrices, notamment en inhibant l'infiltration des CD8+ au sein de la tumeur. Ils inhiberaient également l'effet cytolytique de ces cellules T CD8+, des cellules NK et des cellules NKT. Enfin, ils seraient aussi capables d'inhiber la sécrétion de cytokines par un grand nombre de cellules immunitaires (Orentas *et al.*, 2006).

Ainsi, inhiber la population de cellules T-reg semble nécessaire pour obtenir une immunothérapie antitumorale efficace.

3.2 Autres mécanismes immunitaires en faveur de la progression tumorale

Plusieurs autres phénomènes intervenant dans la réaction immunitaire vont favoriser le développement tumoral.

Les lymphocytes B produisent des anticorps spécifiques des antigènes tumoraux. Si certains sont bénéfiques et induisent une activation du complément lors de leur fixation à l'antigène, d'autres vont participer à un phénomène appelé « facilitation immunologique ». Ce phénomène est lié à la présence d'anticorps dits « bloquants », qui vont se fixer à l'antigène sans entraîner de réaction immunitaire : d'une part ces anticorps sont non protecteurs, mais en plus ils favorisent le développement tumoral en masquant les antigènes tumoraux (Monnet, 2002).

Il a aussi été supposé que les TILs synthétiseraient des cytokines et des facteurs de croissance qui seraient nécessaires à la croissance tumorale. Ainsi les TILs recrutés, activés par les signaux de dangers locaux seraient une source de facteurs trophiques pour la tumeur et échoueraient finalement à exercer leur action antitumorale (Whiteside, 2006).

3.3 Inflammation et cancer

Le traumatisme tissulaire engendré par la croissance tumorale entraîne une infiltration de cellules inflammatoires et la production de cytokines ou facteurs de croissance supprimant ou promouvant la prolifération cellulaire.

Les prostaglandines, notamment PgE2, libérées par les macrophages lors de la réaction inflammatoire, vont diminuer le potentiel d'action des cellules tueuses. Il est à noter que la tumeur elle-même libère des substances nuisibles à la réponse anti-tumorale, telles que des prostaglandines, et des facteurs d'inhibition de la migration des macrophages. (Monnet, 2002)

Il a aussi été démontré que les neutrophiles et macrophages activés pouvaient induire une transformation des cellules normales *in vitro* (par le biais notamment de l'action des cytokines et de la libération de radicaux libres dérivés de l'oxygène et d'oxyde nitrique par les cellules phagocytaires) (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

Ainsi, les cytokines libérées par les macrophages et les neutrophiles (ou les activant) possèdent une activité anti-tumorale indiscutable dans de nombreuses tumeurs, mais les mêmes cytokines peuvent également promouvoir la croissance tumorale dans d'autres modèles tumoraux. La sécrétion d'IL-1 et de TNF pourrait donc favoriser la progression tumorale (croissance mais aussi dissémination à distance). Et les macrophages peuvent libérer sur le site tumoral des cytokines comme le TGF- β (Tumor Growth factor beta) et l'IL-10 qui possèdent des propriétés anti-suppressives (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

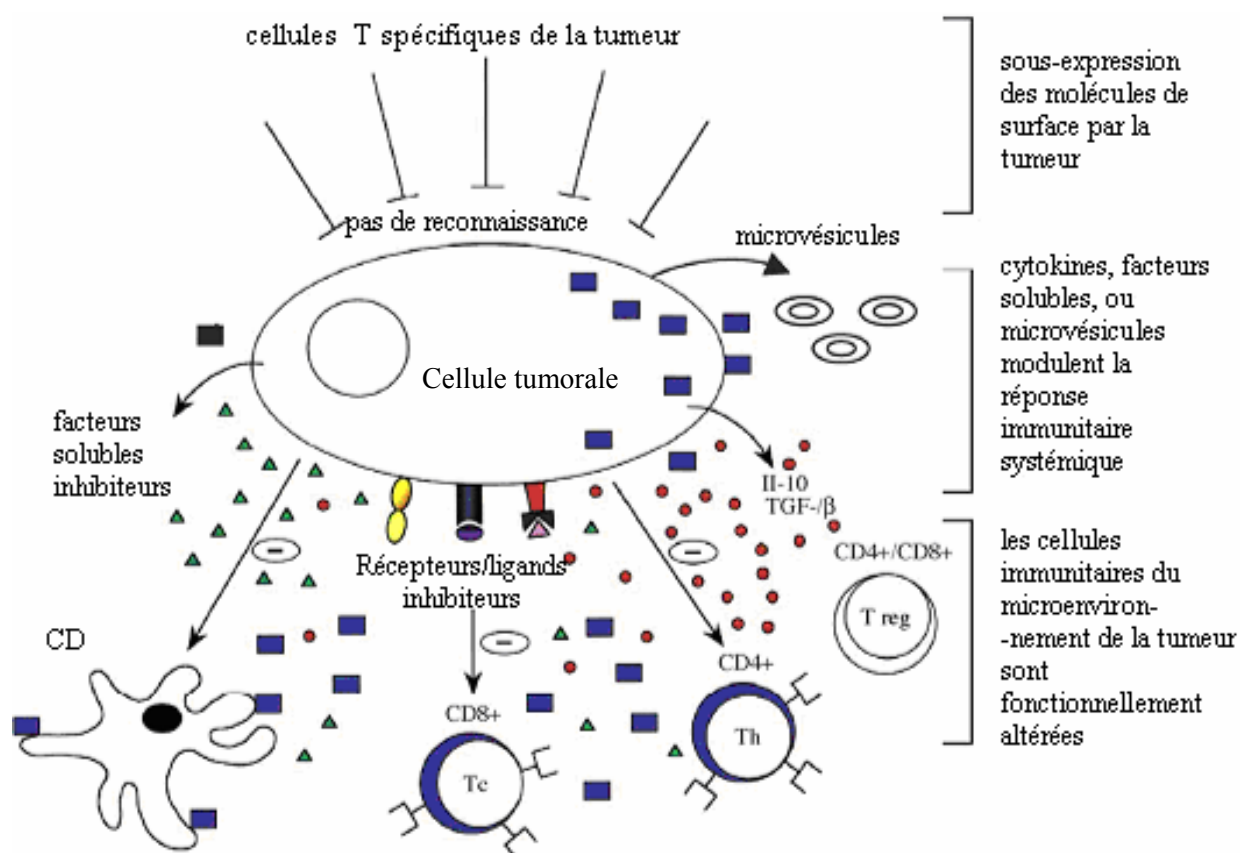
Des études épidémiologiques ont d'ailleurs pu établir un lien étroit entre inflammation chronique et incidence d'apparition de tumeur (Jak'obisiak *et al.*, 2003).

3.4 Sélection des cellules peu immunogènes par le système immunitaire

L'immunogénicité des antigènes tumoraux va créer une « sélection naturelle » au sein de la population de cellules tumorales en croissance. Les antigènes qui sont fortement immunogènes sont facilement reconnus, ciblés et éliminés par le système immunitaire, alors que les antigènes faiblement immunogènes peuvent échapper à la reconnaissance (Broghammer et Ratliff, 2002).

Ce sont les cellules T spécifiques de certains antigènes tumoraux qui vont alors exercer une pression de sélection, et celle-ci va favoriser, sur une tumeur génétiquement instable, la survie et l'expansion des sous-clones cellulaires n'exprimant pas l'antigène en question.

Figure 2 : Bilan des mécanismes d'échappement de la tumeur au système immunitaire.
(Whiteside, 2006)



IV L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE

L'immunothérapie a pour but la modulation du système immunitaire du patient, afin de surmonter l'immunotolérance existant vis-à-vis de la tumeur.

Il existe deux types d'immunothérapie :

- l'immunothérapie passive, qui utilise des agents immunologiques qui, après transfert, vont directement cibler les cellules tumorales sans passer par l'activation du système immunitaire.
- l'immunothérapie active, qui va, au contraire, non pas interférer avec les cellules tumorales directement, mais inciter le système immunitaire à le faire, et donc stimuler une réponse immunitaire endogène.

1 Immunothérapie passive

1.1 Spécifique : thérapie à base d'anti-corps monoclonaux

Les anticorps sont dérivés d'un clone unique de cellules produisant des anticorps dirigés contre un seul antigène, ils sont alors appelés : anticorps monoclonaux (ACm). Lorsqu'ils sont administrés, les anticorps ciblent et se lient spécifiquement aux cellules qui expriment l'antigène spécifique. Secondairement, il peut y avoir activation de la cascade du complément, et augmentation de l'ADCC (Broghammer et Ratliff, 2002).

Les ACm présentent l'avantage d'être transférables d'un individu à un autre, et de pouvoir s'attaquer aux cellules cibles sans activation préalable du système immunitaire du patient receveur. Liés à l'antigène ciblé, les anticorps peuvent provoquer la mort cellulaire par activation du complément, opsonisation, ou ADCC.

Les anticorps peuvent être utilisés dans un but diagnostique ou thérapeutique, mais uniquement pour les tumeurs pour lesquelles des antigènes tumoraux ont été définis (Broghammer et Ratliff, 2002).

Lorsqu'ils sont conjugués à des toxines, des agents de chimiothérapie, ou des radio-isotopes, les AC vont permettre (Broghammer et Ratliff, 2002 ; Huber et Wölfel, 2004 ; Plunkett et Miles, 1999) :

- d'améliorer la visualisation des cellules tumorales (lorsqu'ils sont utilisés dans un but diagnostique)
- de concentrer l'agent thérapeutique au niveau de la tumeur, et d'accroître ainsi l'efficacité du traitement.

Mais la plupart des AC sont d'origine murine, et la majorité des patients (41 à 70%) vont développer des AC dirigés contre les composants murins, ce qui va inactiver les ACm lors des administrations ultérieures. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc à l'étude pour « humaniser » les anticorps monoclonaux (Broghammer et Ratliff, 2002).

L'utilisation des anticorps est limitée par plusieurs choses :

- par le fait qu'ils pénètrent difficilement au sein de la tumeur ce qui diminue leur efficacité,
- par la faible expression antigénique des tumeurs,
- par le fait que les antigènes ciblés peuvent être exprimés dans des tissus normaux,
- et par le développement d'une résistance tumorale.

En effet, les tumeurs vont pouvoir échapper aux anticorps en modifiant l'expression de leurs marqueurs cellulaires et par la sous-expression des marqueurs ciblés ou leur mutation (Broghammer et Ratliff, 2002).

Les anticorps jouent donc un rôle incontestable en tant que thérapie adjuvante et comme agent diagnostique. Actuellement ils sont surtout utilisés pour le traitement des cancers du sein et du lymphome à cellules B (Huber et Wölfel, 2004).

1.2 L'administration de cellules immunitaires

L'administration passive de cellules effectrices actives est aussi appelée « transfert adoptif », les cellules pouvant avoir ou non une spécificité antigénique.

Deux populations de cellules à activité non spécifique peuvent être utilisées : les Lymphocytes Activated Killer (LAK, qui sont des cellules NK activées), et les Cytokines Induced Killer (CIK : sous population de cellules T avec des propriétés NK). Leur activité n'est pas restreinte par le CMH et elles attaquent les cellules cibles de façon non spécifique (Broghammer et Ratliff, 2002).

Les populations spécifiques d'antigène qui peuvent être utilisées sont les Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs : isolés au niveau d'une tumeur) et les vaccins à base de cellules T activées.

La technique du transfert adoptif implique l'isolation de la population cellulaire désirée chez le patient, son activation *in vitro*, suivie par la ré-administration chez l'hôte autologue. La première limite est l'obtention d'un nombre de cellules suffisant pour le transfert (Broghammer et Ratliff, 2002).

Le mécanisme exact d'action des TILs dans l'immunité antitumorale n'est pas clairement défini. Les cellules pourraient avoir un effet direct ou indirect *via* la production de cytokines pro-inflammatoires. Les TILs sembleraient plus efficaces pour réduire le risque de métastases par rapport aux cellules LAK. Mais l'applicabilité des TILs pour la thérapie est limitée pour plusieurs raisons, notamment pour la difficulté de leur préparation et de leur utilisation pratique (Broghammer et Ratliff, 2002).

Il est possible aussi de transférer des clones de cellules T antigènes spécifiques. Le transfert adoptif de CTLs nécessite l'utilisation de cellules dendritiques pulsées avec l'antigène tumoral, et l'expansion des CTLs *in vitro*, suivi de leur ré-administration au patient. Les cultures de lymphocytes T sont stimulées à plusieurs reprises avec les cellules dendritiques autologues modifiées de façon à leur faire présenter les épitopes immunogènes des antigènes tumoraux. Les CTLs spécifiques présentant une forte avidité pour l'épitope sont sélectionnés puis cultivées jusqu'à obtenir un nombre de cellules suffisant pour le transfert adoptif. L'avantages de ces clones de cellules T spécifiques d'un antigène, par rapport aux TILs, est qu'ils fournissent des cellules effectrices présentant une spécificité et un phénotype uniforme, ce qui va permettre de conserver la stimulation des réponses physiologiques grâce à l'antigène et à une faible dose d'IL-2. Les cellules T sont multipliées *ex vivo*, cela leur évite de subir l'environnement immunosuppresseur rencontré chez l'hôte de la tumeur (Totterman *et al.*, 2005).

Parfois il est réalisé une myéloablation partielle avant le transfert des cellules T. cette lymphodéplétion crée une homéostasie favorable à la survie des lymphocytes et des signaux de prolifération pour les cellules T transférées (Totterman *et al.*, 2005).

La limite est surtout la difficulté à générer un nombre suffisant de cellules effectrices pour chaque patient. Pour contourner ce problème, les chercheurs ont commencé à développer des TCR spécifiques d'antigènes tumoraux dits « universels », pour les transférer génétiquement dans les cellules T des patients cancéreux. Ces recherches sont actuellement au stade du développement préclinique (Huber et Wölfel, 2004).

2 Immunothérapie active

2.1 Immunothérapie non spécifique

2.1.1 Avec des bactéries ou des composants bactériens

La stimulation du système immunitaire par des bactéries vivantes constitua les prémices de l'immunothérapie. Dès le début des années 80, le Dr Coley remarqua que certains patients cancéreux présentaient une régression de leur tumeur lorsqu'ils contractaient une infection bactérienne aiguë. Il commença par injecter des bactéries vivantes chez un patient avec un cancer avancé, puis ensuite il mit au point un mélange de bactéries plus sûr et plus efficace pour le traitement des patients cancéreux (Huber et Wölfel, 2004).

Depuis, les mécanismes de rejets tumoraux induits par des agents immunostimulants non spécifiques ont été élucidés et on a pu développer des protocoles qui sont aujourd'hui couramment utilisés en clinique. Le meilleur exemple est représenté par les instillations intravésicales du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) qui représente le traitement habituel de certains stades de cancers superficiels de la vessie.

L'efficacité limitée et la toxicité significative de cette approche ont conduit à l'exploration du potentiel « immunostimulateur » des composants bactériens ou des bactéries génétiquement modifiées. Parmi les éléments qui attirent particulièrement l'attention des chercheurs se trouvent les CpG désoxynucléotides (Huber et Wölfel, 2004)

2.1.2 Par injection de cytokines recombinantes

Avec la découverte des interférons dans le milieu des années 1950, le vaste domaine des cytokines inflammatoires commença à être exploré. Comme vu précédemment, les cytokines peuvent, suivant leur nature et le type tumoral, favoriser ou inhiber la croissance tumorale.

Les interférons présentent une activité antinéoplasique *in vitro* et *in vivo* et on a constaté que les souris knock out pour le récepteur aux interférons présentaient un développement tumoral plus important. Les effets anti-tumoraux des interférons semblent impliquer des mécanismes directs et indirects incluant une augmentation de l'expression des molécules du CMH, l'augmentation de la cytotoxicité cellulaire, et une activité anti-angiogénique (Plunkett et Miles, 1999 ; Huber et Wölfel 2004).

Dans le début des années 1980, après le clonage de multiples gènes codant pour des cytokines et le début de la production de protéines par les technologies d'ADN recombinant, des essais cliniques de grande ampleur ont pu être effectués afin d'étudier la potentielle utilité de nombreuses cytokines dans le traitement des cancers. Mais les réponses bénéfiques furent assez rares, et associées à des effets indésirables importants. Un exemple d'utilisation de cytokines est l'IFN- α , qui peut induire des rémissions complètes dans certains types de leucémie. Mais à l'exception d'un petit nombre de patients avec un carcinome rénal avancé ou atteints de mélanome malin, répondant aux traitements à l'IFN- α ou à l'IL-2, la plupart des tumeurs solides, les leucémies à haut risque et les lymphomes, sont en grande partie résistants à l'administration de cytokines (Huber et Wölfel, 2004).

2.2 Immunothérapie spécifique : la vaccination anti-tumorale

L'absence de réponse efficace contre les cellules cancéreuses chez le patient représente un échec patent à ce concept d'immunosurveillance. La présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T semble être l'une des étapes déficientes expliquant cet échappement immunologique des tumeurs (Bernard et Kochman, 1997).

Si cette étape est déficiente, il semble logique qu'en apportant une présentation antigénique correcte par des méthodes de vaccination, on obtienne une réponse immunitaire efficace.

2.2.1 Principe

La vaccination anti-cancéreuse consiste à administrer des antigènes tumoraux à un patient cancéreux, dans le but d'induire une réponse cellulaire spécifique. Elle a été très étudiée dans un grand nombre de cancers.

Contrairement à ce que l'on souhaite obtenir avec la vaccination prophylactique utilisée contre des agents infectieux, c'est-à-dire une immunité humorale neutralisante, le principal objectif de la vaccination anticancéreuse est d'obtenir une réponse cellulaire T, spécifique de la tumeur.

On sait qu'il est nécessaire d'avoir au préalable une présentation antigénique appropriée pour pouvoir induire une immunité acquise cellulaire efficace contre le cancer. Et pour être présentés aux cellules T, les antigènes doivent être complexés aux molécules du CMH exprimées au niveau de la membrane cellulaire : de type I pour les cellules T cytotoxiques et de type II pour les cellules T helper. Comme les cellules tumorales manquent généralement d'antigènes immunogènes, et sous-expriment les molécules du CMH sur leur membrane cellulaire, ils ne vont pas stimuler suffisamment le système immunitaire acquis. En vaccinant les patients avec des antigènes tumoraux, ce mécanisme d'échappement peut être contourné.

Un vaccin anti-cancéreux peut être administré au patient sous forme de cellules entière ou de lysats de cellules tumorales (seules ou chargées par des CPA), de peptides dérivés d'antigènes tumoraux (seuls ou chargés par des CPA) s'ils sont connus pour le type de cancer concerné, ou d'ADN par l'intermédiaire d'un vecteur viral ou plasmidique. Il est souvent administré en association avec un adjuvant immuno-modulateur tel que le BCG, l'hémocyanine de patelle, ou des cytokines (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

2.2.2 Nature de l'agent vaccinal

➤ Immunisation à partir de cellules tumorales ou d'extraits tumoraux (peptides ou protéines entières) :

Cette technique était utilisée aux débuts des essais de vaccination. Les cellules ou extraits tumoraux peuvent être utilisés seuls ou en association avec un adjuvant non spécifique (BCG ou adjuvant de Freund) qui a pour rôle de favoriser le développement d'une inflammation locale au site d'administration.

L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas d'avoir au préalable identifié des antigènes spécifiques tumoraux. Cela permet en outre la présentation d'antigènes naturels multiples, augmentant la probabilité d'activer une réponse dirigée contre des antigènes importants, et réduisant les possibilités d'échappement tumoral (Broghammer et Ratliff, 2002).

Il est possible d'utiliser des cellules tumorales autologues (c'est-à-dire issues du patient) ou allogéniques (issues d'un individu différent mais appartenant à la même espèce).

Les vaccins autologues ont l'avantage d'être, par définition, compatible avec le CMH du patient receveur. Cependant, cette méthode nécessite que le patient ait une tumeur accessible chirurgicalement, et assez grande pour fournir un nombre suffisant de cellules pour préparer le vaccin (soit 50 à 100 x 10⁶ cellules, en général une masse de 2,5 cm de diamètre suffit). En général ce critère est fortement susceptible d'être rempli après la résection chirurgicale de la masse (Plunkett et Miles, 1999).

Des vaccins allogéniques peuvent être préparés à partir de lignées cellulaires sélectionnées pour fournir un grand nombre d'antigènes tumoraux et un large spectre d'expression de molécules du CMH. Ainsi les vaccins allogéniques sont plus immunogènes, et les réponses immunitaires dirigées contre les molécules du CMH étrangères peuvent induire une puissante réponse auxiliaire

dirigée contre les antigènes tumoraux croisés. Les vaccins à base de cellules allogéniques fournissent une exposition à de multiples antigènes tumoraux connus, ainsi qu'à des antigènes encore non identifiés. C'est pour cela qu'ils ont été plus largement utilisés (Plunkett et Miles, 1999).

➤ Vaccinations à partir de peptides de synthèse :

De nombreux antigènes tumoraux ont été clonés, et donc, des peptides dont la séquence correspond à des épitopes reconnus par les cellules T, peuvent aujourd'hui être synthétisés.

L'utilisation d'antigènes définis a pour avantage de ne pas nécessiter d'avoir à sa disposition des tissus tumoraux frais, rendant la vaccination anti-tumorale possible dans les situations où le tissu tumoral est réduit ou en cas de récurrence. De plus, les vaccins spécifiques d'antigène pourraient avoir une efficacité supérieure, et ils sont moins susceptibles d'induire une réaction auto-immune (par rapport aux vaccins avec cellules entières), et fournissent un marqueur pour surveiller la réponse (Broghammer et Ratliff, 2002).

Un point important dans la vaccination à partir d'antigènes tumoraux est de trouver un support optimal pour administrer les antigènes. L'idéal est que l'antigène soit présenté avec une molécule du CMH de classe I ou II. Il est important de préciser que les vaccins peptidiques sont, par définition, restreints à une utilisation chez des patients exprimant l'allèle HLA approprié (Broghammer et Ratliff, 2002).

➤ Vaccination avec des antigènes glucidiques :

Les antigènes glucidiques, surexprimés ou exprimés de façon aberrante au niveau des cellules tumorales, semblent constituer de futures cibles pour l'immunothérapie. En effet certains gangliosides ont déjà été utilisés comme immunogènes dans certains cancers (Plunkett et Miles, 1999).

➤ Vaccin à base d'ADN :

Une technique potentiellement plus sûre que l'utilisation de virus recombinants est d'utiliser de l'ADNc nu comme agent immunogène. Cette technique est en cours de développement, mais les premières études réalisées sur les animaux de laboratoire semblent avoir fourni des résultats intéressants (Plunkett et Miles, 1999).

➤ Limites :

Malgré l'identification de nombreux les antigènes tumoraux, le développement de stratégies immunothérapeutiques efficaces a été très limité par le manque de moyens pour induire une réponse efficace contre ces antigènes à faible pouvoir immunogène et généralement dérivés du soi. Les échecs des vaccins anticancéreux sont liés à la complexité de la relation entre l'hôte et la tumeur. En effet, lorsque le système immunitaire rencontre un nouvel antigène en périphérie, le résultat n'est pas nécessairement une activation : quand l'antigène est exprimé de façon endogène, et en l'absence de signaux qui accompagnent une destruction tissulaire et une inflammation, le résultat classique est une tolérance immunologique. Ainsi, le but primaire de l'immunothérapie spécifique devrait être de renverser cette absence de réponse au cancer et briser le phénomène de tolérance. Deux stratégies majeures ont été étudiées : l'utilisation de cytokines avec les vaccins, et l'utilisation d'adjuvants cellulaires, notamment les cellules dendritiques (qui représentent la seule population de cellules immunitaires capables d'atteindre cet objectif) (Sprinzl *et al.*, 2001).

2.2.3 Support utilisé pour la présentation des antigènes

Le virus vaccinia, et les cellules présentatrices d'antigène spécialisées (incluant les cellules dendritiques, et les macrophages) ont été très étudiés comme supports vaccinaux. Nous nous appliquerons à préciser la vaccination à base de cellules dendritiques, qui est considérée comme la méthode vaccinale la plus prometteuse.

➤ Utilisation des cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques sont une classe importante de cellules spécialisées dans la présentation antigénique. Dans les tissus lymphoïdes, ce sont des stimulateurs importants de la réponse T. Elles augmentent les niveaux d'expression des molécules du CMH de classes I et II et sont considérées comme les CPA les plus puissantes (Broghammer et Ratliff, 2002). En effet, parmi toutes les cellules présentatrices d'antigène professionnelles, les cellules dendritiques sont les plus efficaces dans l'activation des cellules T au repos, dans l'activation de cellules T naïves *in vivo*, et surtout ce sont les seules capables d'induire des CTLs antigène-spécifiques *in vivo* (Bernard et Kochman, 1997 ; Plunkett et Miles, 1999).

Du fait de leur capacité à induire une réponse à médiation cellulaire (forte capacité de présentation antigénique et capacité à fournir les molécules nécessaires à l'activation des cellules T), des études ont été menées pour évaluer l'utilisation potentielle des cellules dendritiques pour induire une réponse antitumorale (Broghammer et Ratliff, 2002).

Une première limite aux études de vaccinations à base de cellules dendritiques a été de produire une quantité suffisante de cellules dendritiques. Il existe deux approches pour l'obtention de cellules dendritiques : 1) extraire les cellules dendritiques immatures du sang périphérique et 2) différencier *in vitro* les cellules dendritiques à partir des précurseurs CD34+ ou de monocytes sanguins. Mais il est à présent possible de produire des cellules dendritiques en quantité suffisante à partir du sang périphérique et en utilisant du GM-CSF et de l'IL-4 (Sprinzl *et al.*, 2001).

D'après Bernard et Kochman (1997), les qualités exploitables des cellules dendritiques sont les suivantes :

- le transfert dans la cellule dendritique d'un gène codant pour un antigène tumoral entraîne l'expression endogène de la protéine tumorale. Les épitopes antigéniques sont alors présentés aux lymphocytes T CD8 + par les molécules du CMH classe I,
- la possibilité de sensibiliser la cellule dendritique par incubation avec des peptides d'antigènes tumoraux obtenus par synthèse chimique ou par élution de la surface des cellules tumorales. Les cellules dendritiques ainsi pulsées présentent les antigènes également en association avec les HLA classe I.

La stratégie la plus fréquemment utilisée est de pulser les cellules dendritiques avec des peptides synthétiques dérivés d'antigènes tumoraux. Cette méthode requiert bien évidemment la connaissance de l'haplotype du patient et la séquence du peptide correspondant. Pour éviter la formation de variants échappant à la réponse immunitaire, il est recommandé d'utiliser un mélange de peptides dirigés contre différents épitopes. Pour atteindre ce but, des méthodes utilisant des lysats de cellules tumorales entières, de l'ARN tumoral complet, des cellules tumorales nécrotiques ou apoptotiques, ou les produits de fusions de CD et de cellules tumorales, ont été développées. Ces méthodes étant conçues pour stimuler l'immunité qui est également dirigée contre des antigènes tumoraux qui n'ont pas encore été identifiés, de tels vaccins pourraient avoir de meilleures propriétés de présentation antigéniques en comparaison avec un pulsage de peptides ne contenant que des cibles déjà identifiées (Sprinzl *et al.*, 2001).

Il est important de préciser qu'un tel vaccin est plus susceptible d'être efficace lorsque la taille de la tumeur est minimale, puisque l'immunosuppression induite par la tumeur est ainsi minimale. Ainsi la vaccination à base de cellules dendritiques doit plutôt être considérée comme une thérapie adjuvante à la chirurgie, ou après une chimiothérapie (Sprinzl *et al.*, 2001).

➤ Les virus et bactéries recombinants :

Des virus transfectés avec de l'ADNc codant pour un antigène tumoral ont été développés. Le virus agit comme un adjuvant en altérant l'apprêtement intra- et extracellulaire de l'antigène, et fournit un substrat supplémentaire pour la reconnaissance immune spécifique et non spécifique. Il est également possible de générer des vecteurs viraux recombinants exprimant des molécules immunomodulatrices en plus des antigènes tumoraux (Plunkett et Miles, 1999).

Cependant, une immunisation et des injections répétées avec un même virus recombinant peuvent induire une puissante réponse immunitaire dirigée contre le virus lui-même. Ces réponses limitent l'immunogénicité des antigènes tumoraux, et d'après Plunkett et Miles, cela pourrait être lié à une élimination trop rapide du virus recombinant. D'après ces mêmes auteurs, une autre hypothèse serait que la réponse dirigée contre les épitopes immunodominants du vecteur pourrait supprimer la réponse dirigée contre les épitopes plus « faibles » des antigènes associés à la tumeur. Ce problème pourrait être facilement surmonté en utilisant différents vecteurs viraux exprimant le même antigène tumoral (Plunkett et Miles, 1999).

➤ Nouveaux vaccins à base de cellules tumorales génétiquement modifiées de façon à exprimer des molécules de costimulation, des molécules du CMH, ou des cytokines :

Le développement de vaccins antitumoraux plus performant démontre clairement l'importance croissante de la thérapie génique ou du transfert de matériel génomique à l'intérieur des cellules. La thérapie génique est utilisée pour stimuler la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la libération de cytokines ou en augmentant l'expression de molécules telles que le CMH de classe I ou d'autres molécules de costimulation. Ce large potentiel thérapeutique reste limité par l'administration des gènes et l'induction de leur expression.

2.2.4 Bilan : choix de la technique vaccinale et résultats.

Il n'a toujours pas été clairement défini quelle était la technique vaccinale la plus efficace, et des études cliniques comparatives sont rapidement requises. Les essais de vaccination déjà réalisés, qui ont surtout concerné le traitement des mélanomes, n'ont entraîné de réponses cliniques que dans une relativement faible minorité de patients atteints de cancers avancés, et avec des effets indésirables modérés (Huber et Wölfel, 2004).

Le *tableau 1* page 30 résume les résultats et inconvénients de chaque technique vaccinale.

Tableau 1 : Vue d'ensemble des stratégies vaccinales anticancéreuses.

(Source : Schenk-Braat et Bangma, 2005)

Vaccin	Efficacité clinique	Inconvénient potentiel
Cellules tumorales autologues ou allogéniques, entières ou lysat tumoral	Réponse immune reportée, pas de réponse clinique clairement observée dans la plupart des essais.	Complexité de mettre en place des vaccins personnalisés. Faible immunogénicité des cellules tumorales à cause des mécanismes d'immunosuppression
Peptides dérivés des tumeurs	Réponses cliniques démontrées dans le mélanome	Connaissance des antigènes spécifiques de tumeurs et correspondant à l'haplotype requis. Convient uniquement pour les patients dont l'allotype HLA correspond. Risque de changement du phénotype antigénique des cellules tumorales.
Cellules tumorales autologues ou allogéniques modifiées génétiquement.	Réponses cliniques reportées pour un grand nombre de cancer	Complexité de mettre en place des vaccins personnalisés. Faible immunogénicité des cellules tumorales liée aux mécanismes d'immunosuppression.
Vecteur viral transportant un gène codant pour un antigène tumoral	Réponse immune spécifique du virus ou de l'antigène reportée, pas de données sur les réponses cliniques	Connaissance des antigènes spécifiques de la tumeur nécessaire. Faible immunogénicité due à l'inactivation du virus par des anticorps neutralisants, les épitopes viraux dominants ou la réponse humorale.
ADN plasmidique nu codant pour des antigènes tumoraux	Réponse immunitaire rapportée, pas de réponse clinique observée.	Connaissance des antigènes spécifiques de la tumeur nécessaire. Faible efficacité de transfection des CPA <i>in vivo</i> .
CPA autologues présentant un antigène tumoral.	Réponse clinique rapportée pour un certain nombre de cancers.	Complexité des vaccins personnalisés.

Les raisons possibles d'un échec suite à une vaccination antitumorale sont multiples. Il peut être dû à l'emploi d'un antigène inapproprié, à un échappement tumoral *via* la perte de l'antigène tumoral ou à un changement dans son apprêtement et sa présentation, à la libération de cytokines immunosuppressives par les cellules tumorales ou à l'indifférence du stroma. Les réponses obtenues suite à une vaccination à base de peptides tumoraux sont fortement individuelles et notamment, les cibles sont très hétérogènes et très changeantes. En effet les cellules tumorales se caractérisent souvent par une grande hétérogénéité dans leur expression des différents antigènes tumoraux. Les antigènes exprimés varient en effet d'un sous-clone à un autre. Le risque est alors de favoriser la survie et l'expansion d'un sous-clone n'exprimant pas l'antigène visé (Huber et Wölfel, 2004).

En outre, il a été supposé que l'absence d'un succès immédiat de l'immunisation par les cellules dendritiques est probablement due à la complexité de la relation hôte-tumeur : un procédé de sélection naturelle provoquerait un enrichissement sélectif des clones des cellules tumorales hautement agressives, qui n'exprimeraient plus les antigènes spécifiques des cellules tumorales d'origine. Une activation spécifique contre ces antigènes entraînerait alors l'élimination des cellules

exprimant l'antigène, alors que les cellules tumorales les plus dangereuses pourraient échapper au contrôle immunitaire (Sprinzl *et al.*, 2001).

Une autre hypothèse expliquant le faible taux de réponses cliniques lors des essais de vaccination avec des CD, serait que les CD pulsées avec l'antigène seraient capables d'activer les cellules CD4⁺ CD25⁺ T-reg, et cela entraînerait la suppression de l'activation des cellules T effectrices (Orentas *et al.*, 2006).

- *Les résultats de la vaccination antitumorale sont variables. La vaccination à partir de multiples épitopes semble induire une meilleure réponse, ainsi que l'emploi de cytokines (GM-CSF, et IL-2) en tant qu'adjuvants. Les cellules dendritiques semblent être les CPA idéales pour les vaccins peptidiques à cause de leurs fortes capacités naturelles de présentation antigénique. Le développement futur de la vaccination antitumorale pourra se faire parallèlement à la découverte d'antigènes spécifiques de tumeurs et l'avancée de potentiels antigènes glucidiques.*
- *Il reste encore beaucoup de points à définir concernant le choix des antigènes tumoraux optimum, leur capacité à induire un rejet tumoral, et les protocoles de vaccination les plus efficaces.*

3 Les antigènes tumoraux

Pour développer les techniques d'immunothérapie spécifiques vues précédemment, il est souvent nécessaire d'avoir défini au préalable les antigènes spécifiques de la tumeur.

En effet, les tumeurs vont présenter à leur surface des antigènes qui leur sont spécifiques et que le système immunitaire va pouvoir reconnaître pour éliminer les cellules tumorales de l'organisme.

Ils apparaissent à la surface des cellules cancéreuses par deux mécanismes principaux : une mutation affectant en particulier des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, ou une néo-expression de gènes silencieux dans les cellules normales (Bernard et Kochman, 1997).

Les antigènes de rejet tumoral ont été étudiés principalement dans les mélanomes, mais ils sont plus ou moins exprimés dans la plupart des cancers humains sous la forme de peptides de 8 à 10 acides aminés présentés par une molécule de classe I du CMH (Bernard et Kochman, 1997). L'immunothérapie spécifique nécessite la mise en évidence de ces antigènes tumoraux et plus précisément des peptides issus de ces antigènes et qui vont être reconnus par les lymphocytes T CD8⁺.

3.1 Caractéristiques d'un gène codant pour un antigène de rejet tumoral potentiel

Plusieurs critères sont requis pour qu'un gène puisse engendrer un antigène de rejet tumoral.

Tout d'abord un haut niveau d'expression est nécessaire, de façon à permettre une présentation maximale de l'épitope à la surface de la cellule tumorale.

Le niveau d'expression de ce gène doit être minimal au niveau du tissu normal, pour éviter des complications auto-immunes ou des problèmes de tolérance.

Dans l'objectif d'une utilisation pratique en clinique, il est préférable que ce gène soit fortement exprimé et qu'il soit exprimé par des tumeurs de type histologique varié.

Enfin, idéalement, un antigène tumoral serait fonctionnellement lié au processus de tumorigénèse et de formation de métastases. En effet, grâce à l'avancée des techniques chirurgicales actuelles concernant les tumeurs solides, la mortalité est souvent liée à la dissémination métastatique. Or cela permettrait au vaccin de cibler aussi les cellules métastasées. Ainsi, il est utile de connaître le rôle des antigènes tumoraux identifiés (Bar-Haim *et al.*, 2004)

Ces critères seront à prendre en compte lors de l'étude des antigènes tumoraux des cancers de la vessie dans l'objectif d'une utilisation potentielle comme cible pour la vaccination antitumorale.

→ *Pour qu'un antigène soit utilisable pour la vaccination antitumorale, le facteur de choix le plus important est la spécificité pour la tumeur, ceci afin d'éviter l'induction de maladies auto-immunes (Sprinzl et al., 2001.) Il est également utile que les épitopes aient été définis.*

3.2 Les différents antigènes tumoraux

On distingue plusieurs catégories d'antigènes spécifiques de tumeurs, le classement reposant essentiellement sur la répartition de leur expression au sein de l'organisme et sur leur ressemblance avec les protéines du soi.

3.2.1 Les antigènes partagés avec le soi

➤ Les antigènes spécifiques d'un tissu :

Dans cette catégorie on trouve les antigènes de différenciation tissulaire. Un exemple est le cas du mélanome : un grand nombre de CTL dirigés contre les mélanomes reconnaissent également les mélanocytes (Dangles, 1998). Les antigènes de différenciation tissulaire rencontrés dans le cas du mélanome sont notamment : tyrosinase, gp100, MART 1/ Melan-A (Bar-haim *et al.*, 2004).

Certains auteurs classent aussi dans cette catégorie les gènes appelés « gènes du cancer des testicules », qui sont sélectivement exprimés par les cellules germinales et les cellules cancéreuses à cause de l'activation d'un promoteur.

Les antigènes de différenciation tissulaire sont des protéines intactes du soi, et sont donc concernées par les mécanismes de tolérance. De ce fait, et pour éviter d'induire des processus auto-immuns, ces antigènes constituent des candidats peu attractifs pour l'immunothérapie (Huber et Wölfel, 2004).

➤ Les antigènes partagés avec le soi mais spécifiques de la tumeur :

Parmi cette catégorie, on trouve des gènes qui sont uniquement exprimés au niveau de la tumeur et silencieux dans les tissus normaux, ou exprimés de façon ubiquitaire mais surexprimés au niveau des cellules tumorales.

Les gènes de la famille MAGE sont un exemple de gènes uniquement exprimés au niveau de la tumeur. Comme exemple de gènes surexprimés par certaines tumeurs il y a aussi HER 2/neu.

Cela peut aussi être des gènes qui sont fréquemment mutés tels que p53, qui est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs.

On rencontre aussi dans cette catégorie le cas des protéines virales servant d'antigènes tumoraux. C'est le cas par exemple de l'Human Papilloma Virus : HPV16-E6, et des antigènes de l'hépatite B et C (Huber et Wölfel 2004 ; Bar-Haim *et al.*, 2004).

Les antigènes correspondants constituent des cibles intéressantes pour la vaccination antitumorale de par leur spécificité.

3.2.2 Les antigènes spécifiques de la tumeur

Ces antigènes sont dérivés de gènes mutés, qui sont souvent associés au processus d'oncogénèse.

Ils constituent des néo antigènes qui ne sont probablement pas soumis à la tolérance au soi. Cet avantage est contrebalancé par la grande hétérogénéité de ces antigènes spécifiques de tumeur, ce qui

limite leur utilité comme cible universelle d'immunothérapie anticancéreuse (Huber et Wölfel, 2004).

3.3 Les techniques de mise en évidence des antigènes tumoraux

3.3.1 Approche génétique

Cette approche a été la première méthode utilisée pour mettre en évidence des antigènes tumoraux (Bar-haim *et al.*, 2004).

Elle consiste à transfecter des cellules avec des fragments d'ADNc tumoral. En testant la capacité des cellules transfectées à activer les CTL autologues spécifiques de la tumeur, il est possible de sélectionner les cellules transfectées ayant intégré le fragment d'ADN codant pour l'antigène tumoral. On réalise ensuite plusieurs digestions de l'ADN intégré par des enzymes de restriction. Puis le séquençage des petits fragments d'ADN permet de connaître la séquence du peptide antigénique présenté par une molécule de classe I du CMH aux CTL (Huber et Wölfel, 2004 ; Dangles, 1998).

3.3.2 Approche biochimique

L'approche biochimique consiste à extraire les peptides épitopes de la molécule du CMH de classe I sur laquelle ils sont présentés à la surface des cellules tumorales. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie et les fractions obtenues sont testées quant à leur capacité à stimuler les CTL.

La spectrographie de masse est ensuite utilisée pour caractériser les peptides contenus dans la fraction stimulant une réponse cytotoxique. A l'aide de banques de données et de la séquence du peptide, il est parfois possible d'identifier la protéine antigénique. Plusieurs antigènes impliqués dans le rejet de mélanomes ont ainsi été identifiés.

L'inconvénient de cette technique est qu'elle est relativement longue, puisqu'il faut noter que trois à six molécules de classe I sont exprimées par un individu donné, et présentent 10 000 à 50 000 peptides différents (Dangles, 1998 ; Huber et Wölfel, 2004).

3.3.3 Immunologie inverse

Cette technique se distingue des deux autres par la démarche employée. Elle s'effectue en plusieurs étapes : (Bar-haim *et al.*, 2004, Dangles 1998)

- Choix d'une protéine candidate
- Recherche, au sein de cette protéine, de motifs de liaison avec un allèle HLA choisi : cela a pour but d'identifier un certain nombre de peptides qui vont pouvoir se lier à une molécule HLA.
 - o Synthèse des peptides correspondants
- Test de liaison *in vitro* des peptides synthétisés avec la molécule HLA choisie
 - o Sélection des peptides qui se lient effectivement à cette molécule HLA
- Détermination de l'immunogénicité des peptides sélectionnés : on étudie la capacité de ces peptides à induire *in vitro* des CTL spécifiques de chaque peptide testé, à partir de lymphocytes T naïfs ou issus d'individus malades.
 - o Sélection des peptides immunogènes
 - o Obtention de lignées de CTL dirigées contre les complexes peptide/HLA sélectionnés
- Il faut ensuite déterminer si le peptide étudié est effectivement naturellement apprêté par la cellule exprimant la protéine, et présenté avec la molécule HLA de classe I.
 - o On utilise pour cela les lignées de CTL établies à l'étape précédente, et on évalue leur capacité à reconnaître les cellules tumorales exprimant la protéine candidate.

4 S'opposer aux mécanismes d'échappement tumoral

Parmi les facteurs connus contribuant à l'échappement, on peut citer le phénotype HLA classe I fréquemment muté dans les tumeurs humaines et qui altère la présentation des peptides, l'inactivation des lymphocytes T par les cellules tumorales qui induisent leur apoptose, et l'incapacité des cellules tumorales à activer une réponse T efficace faute de costimulation suffisante.

L'immunothérapie a donc commencé à cibler les mécanismes d'échappement tumoral par la modulation des molécules de surface cellulaire, ceci en administrant aux cellules tumorales des gènes codant pour le CMH de classe I, de classe II, ou codant pour d'autres molécules de costimulation (Broghammer et Ratliff, 2002).

Un autre moyen de pallier un tel déficit de coactivation est l'utilisation de CPA professionnelles, qui constitue une bonne stratégie thérapeutique pour induire des réponses antitumorales spécifiques efficaces. En effet, les cellules dendritiques, caractérisées par leur aptitude à stimuler des réponses immunes primaires et à activer directement les lymphocytes CD8+ précurseurs, représentent des candidats de choix pour une thérapie immunitaire antitumorale (Bernard et Kochman, 1997).

Enfin nous avons vu que pour obtenir une immunothérapie antitumorale efficace, il serait nécessaire d'inhiber la population de cellules T régulatrices. Mais comment cibler directement cette population cellulaire sans en même temps supprimer les cellules T effectrices ? Car les cibles potentielles présentes à la surface de ces cellules sont aussi présentes à la surface des cellules T effectrices activées. Un essai clinique ciblant une de ces molécules de surface : CTLA-4, a été mis en œuvre mais les patients ont développé une auto-immunité. Il a été envisagé de cibler CD25 pour éviter l'induction de maladies autoimmunes. Malheureusement il n'existe pas encore d'équivalent humain de l'anticorps PC61 murin dirigé contre CD25 (Orentas *et al.*, 2006).

Le Denileukin diftotox, une protéine de fusion comprenant l'IL-2 humaine et la toxine diphtérique, tue sélectivement les cellules exprimant un récepteur à l'IL-2 de forte affinité. Mais on ne sait pas encore si cet agent permettrait ou non d'obtenir une déplétion des CD4+CD25+ humaines.

De récents essais ont permis de constater que le cyclophosphamide ou la fludarabine pouvaient inhiber la fonction et réduire le nombre de CD4+ CD25+ T-reg. L'utilisation de ces substances associées à une immunothérapie pourraient à ce jour être la meilleure stratégie de blocage de ces cellules (Orentas *et al.*, 2006).

Ainsi il semblerait que pour optimiser l'immunité anticancéreuse, il faudrait associer des thérapies impliquant un blocage des T-reg, des vaccinations, et une immunothérapie adoptive.

Dans cette partie nous avons vu à quel point le système immunitaire jouait un rôle important pour prévenir l'apparition d'une tumeur. Lorsque celui-ci est insuffisant ou que des cellules tumorales arrivent à y échapper, une tumeur se développe. C'est donc une déficience naturelle ou induite par la tumeur qui va permettre le développement de cette tumeur. On comprend alors l'intérêt de l'immunothérapie pour déjouer les mécanismes d'échappement élaborés par la tumeur, compenser les déficiences du système immunitaire dans son action antitumorale, ou pour stimuler son activité.

Parmi les différentes méthodes présentées, la vaccination antitumorale présente un potentiel intéressant, notamment de par sa spécificité d'action. Cependant il reste encore à définir la technique et le protocole les plus adéquats et les antigènes les plus appropriés, de façon à optimiser les résultats.

L'objectif de notre étude est justement d'éclaircir ce point au sujet des cancers de la vessie en testant ces techniques sur le chien. C'est pourquoi il nous faut maintenant établir les ressemblances des tumeurs vésicales canines et humaines, pour montrer que le chien constitue un bon modèle d'étude.

2^{EME} PARTIE : ETUDE COMPARATIVE DES TUMEURS VESICALES DU CHIEN ET DE L'HOMME

Le but de cette partie est de voir si le carcinome transitionnel spontané du chien peut constituer un modèle pertinent du cancer invasif de la vessie de l'homme.

En effet, de nombreuses nouvelles options thérapeutiques sont en cours de développement actuellement, dont, entre autre, l'immunothérapie, et il est nécessaire de trouver un bon modèle animal afin de pouvoir tester ces nouveaux traitements avant d'envisager de les appliquer à l'homme.

I. CARACTERISTIQUES D'UN BON MODELE ANIMAL

Un modèle idéal pour le cancer chez l'homme devrait être peu coûteux et facilement disponible, et chez lequel le cancer mime la forme tumorale spécifique de l'homme dans ses caractéristiques histopathologiques, ses aspects moléculaires et cellulaires, son comportement biologique, et sa réponse aux thérapeutiques. Notamment, la réponse anti-tumorale et les effets indésirables d'une thérapie spécifique doivent permettre de prévoir la réponse et les effets indésirables chez l'homme (Knapp *et al.*, 2000).

Le carcinome transitionnel invasif de la vessie du chien est un cancer spontané animal présentant des similitudes intéressantes avec le même cancer chez l'homme. C'est pourquoi il est nécessaire de comparer le carcinome transitionnel de la vessie chez le chien et le cancer de la vessie chez l'homme, afin de démontrer si le chien peut être un modèle d'étude utilisable. Nous étudierons donc les caractéristiques citées précédemment, à la fois chez l'homme, et le chien.

II. EPIDEMIOLOGIE, IMPORTANCE

1 Chez l'homme

L'Institut National de Veille Sanitaire rapporte au cours d'une étude effectuée sur l'incidence et le taux de mortalité des cancers en 2000, qu'avec 10 711 nouveaux cas estimés en 2000, le cancer de la vessie se situait au 6^{ème} rang des 23 localisations examinées. Il est placé au 11^{ème} rang des cancers incidents (il représente 3,9 % de l'ensemble des nouveaux cancers), et se situe, par sa fréquence, au 5^{ème} rang chez l'homme et au 16^{ème} rang chez la femme. Les taux d'incidence standardisés (taux par personne et par an) sont de 18,3 chez l'homme et 2,3 chez la femme (Remontet *et al.*, 2003). L'incidence est en augmentation d'environ 1% par an (Chopin et Gattnego, 2002).

D'après l'Institut National de Veille Sanitaire, ce cancer se situe au 11^{ème} rang des décès par cancer, avec 4 558 décès, dont 76 % chez l'homme, et il représente 3 % de l'ensemble des décès par cancer (Remontet *et al.*, 2003). D'après le Comité International de Recherche sur le Cancer (CIRC), les tumeurs de la vessie représenteraient la 3^{ème} cause de décès par cancer (Chopin et Gattnego, 2002). Les taux de mortalité standardisés sont respectivement, chez l'homme et chez la femme, de 6,3 et de 1,1.

Le taux de décès n'est donc pas négligeable et souligne la nécessité de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2 Chez le chien

Les cancers de la vessie représentent moins de 2% de la totalité des cancers, le carcinome transitionnel constituant lui même 1,5 à 2 % de l'ensemble des cancers (Mutsaers *et al.*, 2003).

Les études trouvées dans la littérature ne spécifient pas le taux de mortalité engendré par les cancers sur l'ensemble de la population canine, ces données étant beaucoup moins accessibles qu'en médecine humaine.

III. ETIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES

1 Facteurs extrinsèques

1.1 Le tabagisme

Le facteur de risque le mieux établi est le tabagisme, bien que le lien soit moins fort que celui observé dans les cancers de l'appareil respiratoire (Kirkali et Chan, 2005).

Même s'il est bien reconnu que fumer la cigarette est le facteur de risque le plus important, des facteurs supplémentaires jouent un rôle en modifiant ce risque lié au tabagisme. En effet il existe des populations au tabagisme important, et dont le taux de cancers de la vessie reste bas (par exemple les ancêtres de Polynésie, incluant les indigènes hawaïens et les Maoris de Nouvelle-Zélande). Cela suggère des différences dans le métabolisme des carcinogènes liés au tabagisme. Des agents exogènes (tels que la prise de vitamines) peuvent aussi modifier le risque induit par le tabagisme (Kirkali et Chan, 2005).

Une étude de Glickman *et al.* effectuée en 1989, montre que le risque de cancer de la vessie chez le chien n'est pas relié à l'exposition à la fumée de cigarette, ce qui peut sembler plutôt inattendu. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la dose à laquelle les chiens sont exposés n'est pas suffisamment importante ; en effet, si le risque lié au tabagisme est bien défini, ce n'est pas le cas du risque lié à l'exposition à la fumée de cigarette.

1.2 La profession

C'est le facteur de risque qui a été découvert en 1^{er} et qui représente, du point de vue de son importance, le 2^{ème} facteur de risque des cancers de la vessie. L'exposition professionnelle est en effet responsable de 20% des cancers de la vessie (Kirkali et Chan, 2005).

Ainsi l'exposition à la β -naphtylamine, au 4-aminodiphenil (ABP) et à la benzidine, principalement chez les personnes travaillant dans les industries des colorants pour textiles, ou les industries des pneus en caoutchouc, sont les seuls agents spécifiques qui ont été associés de façon univoque aux cancers de la vessie (Kirkali et Chan, 2005).

En fait, les carcinogènes industriels sont des dérivés du tryptophane qui, au cours du métabolisme, vont donner des ortho-amino-phénols, qui peuvent être cancérigènes (notamment l'OHA). Ainsi des tumeurs vésicales ont été induites expérimentalement chez des chiens, en leur administrant de la β -naphtylamine, et on a constaté alors que les urines des chiens traités contenaient un dérivé cancérigène en quantité importante, qui était un ortho-amino-phénol (Brutus, 1993).

A cause des mesures strictes mises en place, ces substances sont à présent bannies des industries chimiques.

Cependant il existe de nombreux autres carcinogènes, et les professions considérées à hauts risques sont les ouvriers travaillant dans l'industrie du textile, du caoutchouc, et dans les industries chimiques, à cause de l'exposition à des amines aromatiques (arylamines). Un risque accru a aussi

été détecté chez les peintres ce qui est à corrélérer avec une exposition à certains constituants carcinogènes présents dans les peintures. Un risque modéré a été également constaté chez les ouvriers du cuir, et les cordonniers (Kirkali et Chan, 2005).

Enfin un risque accru a aussi été observé chez les ouvriers de l'aluminium, du fer, et chez les sidérurgistes. Il pourrait être lié à une exposition aux amines aromatiques et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans la fraction volatile du brai de goudron de houille.

De nombreuses études ont cherché à évaluer le risque lié à l'exposition aux gaz d'échappement du diesel, et il semble de plus en plus évident que cela augmenterait modérément le risque.

Hayes *et al.* ont montré dans une étude réalisée en 1981, que le chien réagissait aux agents cancérigènes chimiques de la même façon que l'homme. Le temps de latence entre la 1^{ère} exposition et l'apparition d'un cancer est de 52 ans chez l'homme et de 10 ans chez le chien. Le chien peut donc être utilisé comme « sentinelle » pour détecter précocement un risque de tumeur vésicale d'origine environnementale. Des études d'épidémiologie analytique réalisées à la fois chez le chien et l'homme révèlent que le risque relatif de développer une tumeur vésicale semble proportionnel au taux d'industrialisation de la région d'origine (Mutsaers *et al.*, 2003).

1.3 Les infections urinaires chroniques

Chez l'homme, les infections urinaires chroniques sont associées avec le développement de cancers de la vessie, notamment le carcinome squameux invasif. Cela pourrait être lié à la formation de nitrites et de nitrosamines par la flore bactérienne ou par le processus inflammatoire, qui conduit à une prolifération cellulaire, ce qui augmente le risque d'apparition de mutations génétiques spontanées (plus d'opportunités) (Kirkali et Chan, 2005).

D'après Macy *et al.* (1983), les inflammations urinaires chroniques pourraient également augmenter le risque de tumeurs vésicales chez le chien.

1.4 Autres facteurs

Paradoxalement, le *cyclophosphamide*, un agent alkylant utilisé dans le traitement des néoplasmes malins, (notamment les affections lymphoprolifératives ou myéloprolifératives) augmente le risque de tumeur vésicale chez l'homme (Kirkali et Chan, 2005) et chez le chien (Macy *et al.*, 1983), de façon dose dépendante. Cet agent est très toxique pour la muqueuse vésicale et induit des anomalies au niveau de l'épithélium.

D'autres facteurs de risque ont été identifiés chez le chien tels que :

- L'exposition aux anciens insecticides anti-puces et anti-tiques surtout pour les chiens en surpoids (à cause des composés inertes (dérivés du pétrole) présents dans ces produits, et sachant que travailler dans l'industrie du pétrole est aussi un facteur de risque pour l'homme) (Glickman *et al.*, 1989).
 - o Il est tout de même à noter qu'une étude plus récente de Raghavan *et al.* (2004) a démontré que les spot-on anti-puces et anti-tiques actuels, contenant du fipronil ou de l'imidaclopride, n'augmentaient pas le risque de CCT chez les Scottish terriers.
- La présence du chien dans des marais vaporisés pour le contrôle des moustiques (Knapp *et al.*, 2000).
- L'exposition à des jardins ou pelouses traitées avec des herbicides pour les Scottish terriers (Glickman *et al.*, 2004).

Chez l'homme, les pesticides sont également décrits comme des agents cancérigènes favorisant le développement de tumeurs vésicales (Kirkali et Chan, 2005).



La *radiothérapie* est aussi décrite comme étant un facteur de risque chez l'homme, ainsi que la *chimiothérapie* (thiotepa, melphalan) (Kirkali et Chan, 2005). Dans une étude du Collaborative Radiological Health Laboratory (Nikula *et al.*, 1989), les chercheurs ont induit 38 carcinomes transitionnels sur 990 beagles soumis à une irradiation de tout le corps à faible dose, par des rayons gamma issus d'une source de cobalt.

Chez l'homme, les infections à schistosoma (bilharziose) sont associées aux carcinomes à cellules squameuses de la vessie (Kirkali et Chan, 2005).

Le café serait aussi mis en cause, mais les résultats des études réalisées sont inconstants. La fréquente association tabagisme-café semblerait être à l'origine de la variabilité de ces résultats. Une autre possibilité serait que les personnes à haut risque de cancer de la vessie (c'est-à-dire les fumeurs) boiraient plus de café (Kirkali et Chan, 2005).

→ *Ainsi les facteurs de risque environnementaux sont globalement les mêmes pour le chien et l'homme. Le chien pourrait même servir de « sentinelle » pour détecter les risques de cancers vésicaux d'origine environnementale puisqu'il développe le cancer plus rapidement que l'homme suite à une même exposition.*

2 Facteurs intrinsèques

2.1 Le sexe

2.1.1 Chez l'homme :

D'après l'étude de l'InVS, effectuée en 2000, 84 % des patients atteints de cancers de la vessie étaient des hommes (Remontet *et al.*, 2000).

Ainsi le risque de développer un cancer de la vessie avant l'âge de 75 ans est de 2 à 4% pour un homme et de 0,5 à 1% pour une femme. En clair, le cancer de la vessie est deux à trois fois plus fréquent chez l'homme que chez la femme (Kirkali *et al.*, 2005). Cependant il a été suggéré que la durée de survie rapportée au stade serait plus courte chez les femmes.

Ainsi d'après l'InVS, en 2000, le sex-ratio était de 8,0 (Remontet *et al.*, 2003). Cependant, le Centre International de Recherche sur le Cancer a obtenu des résultats un peu différents, puisque d'après les données qu'ils ont récoltées en 2000, le sexe ratio serait de 1 pour 5 (Chopin et Gattengo, 2002).

L'excès de cancers de la vessie chez les hommes ne s'expliquerait pas complètement par le tabagisme et la profession.

2.1.2 Chez le chien :

Chez le chien, les données sont contradictoires à ce sujet. D'après certains auteurs il n'y aurait pas de prédispositions (Norris *et al.*, 1992) mais plusieurs études rapportent un risque plus élevé chez les femelles (Mutsaers *et al.*, 2003). Notamment, dans l'étude de Knapp *et al.* (2000), le sexe ratio (sur 102 chiens) était de 1,7:1. Ceci est contraire à ce que l'on trouve chez l'homme. Par ailleurs il semblerait que les animaux stérilisés (dans les deux sexes) auraient un risque plus élevé de développer un carcinome transitionnel.

Mutsaers *et al.* (2003) expliquent cela par le fait que les mâles non castrés urinent plus souvent (pour marquer leur territoire) et donc le temps de contact entre la paroi urinaire et les carcinogènes excrétés dans les urines est moins long. Cependant Norris précise que cette explication ne serait

valable que pour les chiens vivant en extérieur, puisque le rythme des sorties par le propriétaire rend le temps de contact de l'urine avec la vessie identique pour les deux sexes (Norris *et al.*, 1992).

2.2 Le nombre d'enfants

Il semblerait que les femmes ayant déjà eu un enfant ont un risque moindre que les femmes nullipares, et le risque diminuerait avec la parité, probablement à cause des changements hormonaux liés à la grossesse (Kirkali *et al.*, 2005).

Cela n'a pas été rapporté chez la chienne.

2.3 L'origine ethnique / la race de chien

Il a été constaté, notamment en Amérique, que les Américains de type africain avaient moitié moins de risque que les Américains de type européen-blanc de développer un cancer de la vessie. Cela pourrait être dû à une moindre détection des tumeurs de bas grade (car le risque est le même pour les tumeurs de haut grade), à des facteurs de risques différents entre ces deux populations, ou à des variations biologiques (différences dans les phases de carcinogenèses, dans la capacité à convertir les pro-carcinogènes en carcinogènes, ...) entre ces deux groupes (Kirkali *et al.* 2005).

Concernant les races de chien, les données sont contradictoires à ce sujet. Pour certains auteurs il n'y aurait pas de prédisposition raciale, pour d'autres il y aurait quelques races prédisposées : tout d'abord le Scottish Terrier, puis le Berger des Shetlands, le Beagle, le Colley, et différentes races de terriers, incluant l'Airedale Terrier, le Fox Terrier à poils durs, et le West Highland White Terrier (Knapp *et al.*, 2000). D'après l'étude de Knapp *et al.* (2000), les scottishs terriers seraient la race la plus prédisposée, avec 19 fois plus de risque de développer un carcinome transitionnel que les autres races.

2.4 Les cancers de la vessie familiaux

Chez l'homme, l'existence de cancers de la vessie familiaux est un phénomène plutôt rare comparé à d'autres types de cancers. Cependant au vu des différentes études réalisées sur le sujet, on peut conclure que le risque de développer un cancer de la vessie est deux fois plus élevé pour les personnes ayant une famille avec un historique de cancer de la vessie. Dans une étude du Swedish Family-Cancer Database datant de 2002 (Kirkali *et al.*, 2005), il a été estimé que 7% de l'occurrence des cancers de la vessie étaient attribuables aux effets génétiques, 12% à des facteurs environnementaux partagés par les membres atteints de la famille, 4% aux facteurs environnementaux présents pendant l'enfance, et 77% à des facteurs environnementaux non partagés par les membres de la famille.

Récemment il a été démontré que des mutations héréditaires au niveau du gène suppresseur de tumeur du rétinoblastome pourraient causer des cancers de la vessie. Les personnes atteintes de rétinoblastomes devraient donc être surveillées à ce niveau (Kirkali *et al.*, 2005).

Ce phénomène de cancer de la vessie familial n'a pas été rapporté chez le chien.

2.5 L'âge

Le risque de développer une tumeur vésicale augmente bien évidemment avec l'âge.

Chez l'homme, l'incidence en fonction de l'âge augmente de façon très importante à partir de 40 ans, l'âge moyen du diagnostic étant de 69 ans chez l'homme et de 71 ans chez la femme (Chopin *et Gattnego*, 2002).

Chez le chien, le pic de fréquence a lieu entre 8 et 10 ans. D'après l'étude de Knapp *et al.* (2000), l'âge moyen était de 11,1 ans. Mais il est tout de même possible de rencontrer une tumeur vésicale sur un chien plus jeune (Henry *et al.*, 2003a).

2.6 L'obésité

L'obésité serait un facteur prédisposant chez le chien. En effet, d'après Glickman *et al.* (1989), le risque lié à l'exposition à des insecticides (les anciens traitements anti-puces) augmente si le chien est en surpoids ou obèse. Cela pourrait être dû à la fixation des composants inertes au niveau de la graisse.

Cela n'a pas été rapporté chez l'homme.

- Une différence importante dans les facteurs de risque intrinsèques concerne l'influence du sexe : chez l'homme les hommes sont beaucoup plus touchés, alors que chez le chien on rencontre plus de CCT chez la femelle.
- Il est aussi intéressant de noter que certains patients ne présentent aucun facteur de risque connus. Le chien pourrait donc être utile en tant que modèle pour identifier des facteurs encore inconnus à ce jour.

IV. TYPES HISTOLOGIQUES ET CLASSIFICATIONS

1 Les types histologiques fréquemment rencontrés

Chez l'homme, environ 90% des tumeurs vésicales sont des carcinomes urothéliaux, aussi appelés « urothelial transitional cell carcinoma » pour les Anglo-saxons. Pour plus de simplicité nous parlerons de carcinome à cellules transitionnelles (CCT). Les tumeurs non épithéliales sont très rares dans la vessie, ne représentant que 2% de toutes les tumeurs vésicales (Renaudin et Moreau 2002a).

D'après une étude issue du Veterinary Data Program, effectuée sur 1164 tumeurs vésicales, les tumeurs vésicales canines sont essentiellement épithéliales (86,5% des cas), et sont représentées dans 70% des cas par les carcinomes à cellules transitionnelles. Les tumeurs non épithéliales représentent 13,5% des cas (Osborne et Finco, 1995).

2 Classification TNM des tumeurs vésicales

2.1 Définition

Pour définir le stade TNM, il faut évaluer le degré d'invasion local de la tumeur primitive (T), et la présence de métastases au niveau des nœuds lymphatiques (N), et/ou à distance (M). Définir le stade de la tumeur est primordial car il permet d'évaluer le pronostic et d'orienter vers le choix du traitement optimal à mettre en place.

Le *tableau 2 (page 43)* résume cette classification et définit les différents stades.

Tableau 2 : Classification TNM des tumeurs vésicales.

(Source : Perabo et Müller (2004), Richie et al. (1998), et Billerey et Sibony, 2001a)

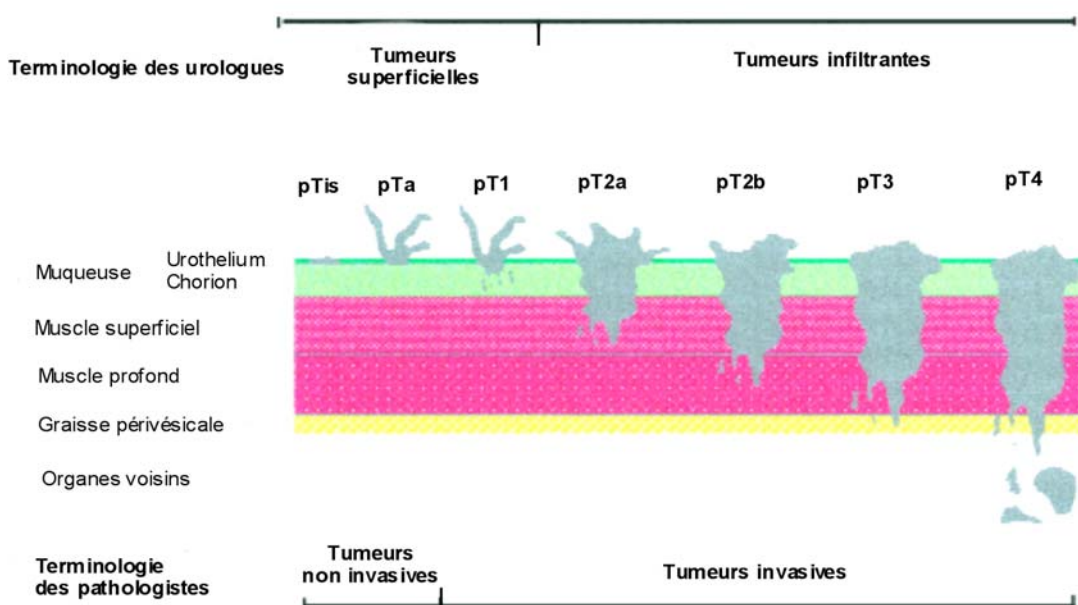
Classification	Description
Tumeur primitive :	
Tis	Carcinome <i>in situ</i> , restreint à la muqueuse
Ta	Carcinome papillaire non infiltrant
T1	Tumeurs envahissant le chorion muqueux - T1a : chorion superficiel - T1b : chorion profond
T2	Tumeurs envahissant le plan musculaire - T2a : muscle superficiel - T2b : muscle profond
T3	Tumeur envahissant le tissu adipeux périvésical - T3a : envahissement microscopique - T3b : envahissement macroscopique
T4	Envahissement des organes de voisinage, de la paroi pelvienne ou abdominale - T4a : prostate, utérus, vagin - T4b : paroi abdominale ou pelvienne
Nœuds lymphatiques locorégionaux	
No	Aucune métastase
N1	Métastases dans un seul NL, mesurant 2 cm ou moins
N2	Métastases dans un seul NL mesurant 2 à 5 cm ou dans plusieurs NL, dont aucun ne mesure plus de 5 cm.
N3	Métastase dans un NL mesurant plus de 5 cm
Métastases à distance	
M1	Métastase dans les organes distants.

Les termes employés diffèrent parfois en ce qui concerne la classification des tumeurs. En effet celles-ci sont habituellement divisées en deux groupes : les tumeurs superficielles et les tumeurs infiltrantes, ou les tumeurs non invasives et les tumeurs invasives. De façon à éviter toute confusion par la suite, la *figure 3 (page 43)* rappelle la définition des différentes terminologies employées.

Précisons que chez le chien la lettre « t » indique un envahissement du trigone. Le « p » précédant les différents stades TNM signifie tumeur « papillaire ».

Figure 3 : Représentation schématique des stades pT, selon la classification pTNM.

(Source : Billerey et Sibony, 2001a)



2.2 Fréquence des différents stades

2.2.1 Chez l'homme :

Lors de la première consultation, environ 70 % des tumeurs de la vessie sont superficielles, et les 30% restants sont des tumeurs envahissant le muscle (infiltrantes). Parmi les tumeurs superficielles, 40 % sont des lésions pTa, 30% sont des lésions T1 et 2 à 5 % sont des carcinomes *in situ* ou des lésions planes (Tis ou CIS) (Chopin et Gattnego, 2002) (voir *figure 4*(page 44).

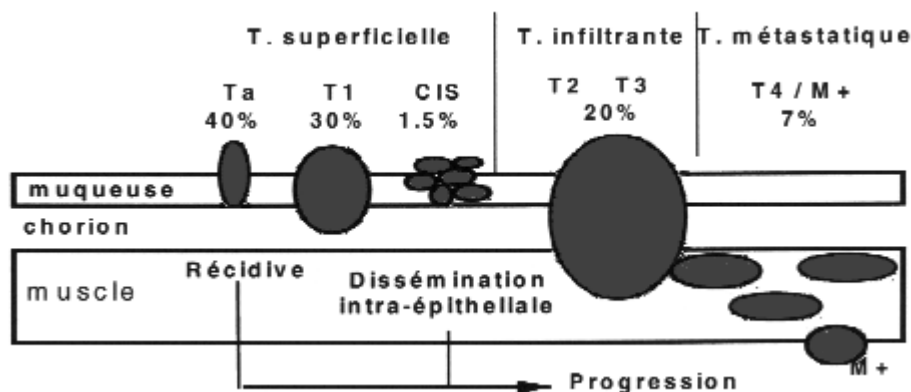
Ainsi, approximativement 75% des cas de tumeurs vésicales sont superficielles, ont une morphologie papillaire, et dérivent de l'urothélium (Perabo et Müller 2004).

Seulement environ 20% des cancers de vessie seraient localement avancés ou métastatiques lors du diagnostic initial, mais un certain nombre de patients ayant eu une cystectomie (surtout pour les stades \geq pT3a) vont récidiver localement ou développer des métastases.

L'association d'une localisation prostatique à une tumeur vésicale existe dans 12 à 40 % des cas suivant les séries (Chopin et Gattnego, 2002).

Figure 4 : Les tumeurs vésicales, modes de présentation et incidences respectives.

(Source : Chopin et Gattnego, 2002)



2.2.2 Chez le chien :

La classification TNM des tumeurs vésicales du chien établie par l'OMS est similaire à celle décrite précédemment chez l'homme.

Une étude réalisée par Knapp *et al.* en 2000 a établi le stade TNM des carcinomes transitionnels de 102 chiens selon cette classification de l'OMS. Il est apparu que 1,9% des chiens (2/102) présentaient un stade T1, 78,4% des chiens (80/102) un stade T2 et 19,6% des chiens (20/102) un stade T3 au moment du diagnostic.

Une atteinte des nœuds lymphatiques (N1 et N2) était présente dans 16% des cas, et des métastases à distance dans 14% des cas. 10% des chiens avaient à la fois une atteinte des nœuds lymphatiques et des métastases à distance. Sur les 102 cas de carcinomes transitionnels, l'urètre était impliqué chez 57 chiens. Et la prostate était impliquée chez 29% des chiens mâles (11/38) de cette étude. Le suivi à long terme a pu être réalisé chez 80 chiens, et 49% d'entre eux présentaient des métastases à distance au moment de leur mort.

Le *tableau 3* page 45 fait le bilan des fréquences des différents stades rencontrés chez l'homme et le chien, afin d'avoir une vision plus comparative.

Tableau 3 : Comparaison des fréquences des différents stades chez l'homme et le chien.

(Source Chopin et Gattnego, 2002, Knapp et al., 2000)

	Ta	T1	CIS	T2	T3	T4	N+	M+
Homme	40%	30%	1,5%	20%		12 à 40%	7%	
Chien	0	1,9%	0	78,4%	19,6%	29%	16%	14%

Le cancer superficiel est peu fréquent chez le chien, bien qu'il représente environ 80% des cancers de la vessie chez l'homme. Différents « chemins » (c'est-à-dire différentes anomalies génétiques) permettent d'aboutir à la formation d'un cancer superficiel ou d'un cancer invasif chez l'homme. D'après Knapp *et al.* (2000) l'hypothèse selon laquelle le cancer superficiel existerait chez le chien mais passerait inaperçu est vraiment peu probable. D'après Knapp les phénomènes nécessaires à la formation d'un cancer superficiel seraient rarement présents ou non fonctionnels chez le chien.

→ Ainsi la majeure partie des tumeurs sont superficielles chez l'homme alors que chez le chien, au moment du diagnostic, elles présentent dans la plupart des cas un stade plus avancé. Il est même fort probable que le cancer superficiel n'existerait pas chez le chien.

3 Classification / grading des tumeurs vésicales

3.1 Définition

Le grade est basé sur l'appréciation d'anomalies architecturales (épaisseur de l'urothélium, polarité cellulaire, maturation en superficie) et cytologiques (anomalies nucléaires, mitoses) de l'urothélium, et ne tient pas compte du caractère invasif ou non de la tumeur. Il est en rapport avec l'agressivité de la tumeur.

Le grade était initialement défini par la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé datant de 1973, qui distinguait les papillomes (tumeurs bénignes) des carcinomes urothéliaux, qui sont classés en 3 grades G1, G2, G3.

Une classification consensuelle des tumeurs urothéliales (des cellules transitionnelles) de la vessie, a été établie par l'Organisation Mondiale de la Santé et la Société Internationale de Pathologie Urologique, en 1998. Cette classification était apparemment nécessaire pour développer un système de classification acceptable pour les tumeurs vésicales, et qui pourrait être utilisée efficacement par les urologues, les pathologistes, les urologues et les oncologues. Ce système englobe non seulement les lésions néoplasiques mais définit également la nomenclature des lésions pré-néoplasiques (Kirkali *et al.*, 2005). L'*Annexe I* représente cette nouvelle classification qui a introduit la notion de tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP : *low malignant potential*), catégorie qui représente une certaine population des G1. Cependant, la plupart des articles utilisent toujours la classification de 1973. Plus récemment encore, la classification de l'OMS a rétabli la classification G1, G2, G3 tout en conservant la notion de tumeurs à faible potentiel de malignité. Ces dernières classifications ne sont pas admises par tous et font l'objet d'une controverse. Ainsi il est recommandé de toujours utiliser pour le Grade la classification de 1973, classification que nous utiliserons le plus souvent par la suite (Chopin et Gattnego, 2002).

3.2 Grades les plus fréquemment rencontrés

3.2.1 Chez l'homme :

D'après Dinney (2006), la grande majorité des cancers de la vessie chez l'homme sont des lésions papillaires exophytiques de bas grade, provenant, à l'origine, d'une hyperplasie ou une dysplasie de bas grade susceptible de récidiver. Ce type de tumeur envahit rarement la paroi de la vessie, ni ne métastase. Les 20% des tumeurs restants sont de très agressifs carcinomes non papillaires, solides, ayant une forte propension à l'invasion et à la métastase.

Selon les statistiques, le carcinome de grade 1 (OMS 1973) représente 60 à 80% des tumeurs de stade pTa, 20% des tumeurs de stade pT1 et n'est quasiment pas décrit dans les tumeurs infiltrant ou dépassant la musculature pT2 ou plus.

Le carcinome de grade 2 représente environ 15 à 30% des tumeurs non invasives, 50 % environ des tumeurs infiltrant le chorion pT1, et aux alentours de 20 % des tumeurs pT2 ou plus.

Enfin le carcinome de grade 3 ne représente qu'une faible part des tumeurs papillaires non infiltrantes avec une fréquence variant de 5 à 20% selon les séries. Ce grade est en fait majoritairement rencontré dans les carcinomes infiltrants et représente environ 60 % des carcinomes pT1 et plus de 70 % des carcinomes pT2 ou au-delà (Billerey et Sibony, 2001a).

3.2.2 Chez le chien :

Dans l'étude de Valli *et al.* (1995) effectuée sur 110 échantillons de tumeurs vésicales canines, 22% étaient de grade 1, 57% étaient de grade 2, et 21% de grade 3. Par contre, dans l'étude de Knapp *et al.* (2000) 81% des tumeurs étaient de grade 2 histologique, et 16% de grade 3. D'après cet auteur, les carcinomes transitionnels de bas grade seraient rares chez le chien et mal caractérisés. En effet dans son étude, la majorité des tumeurs étaient des carcinomes transitionnels papillaires infiltrants de grade intermédiaire à haut.

→ *Il semblerait que les CCT du chien atteignent un caractère invasif à un stade plus tardif que chez l'homme.*

V. LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET ARCHITECTURALES DES TUMEURS VESICALES

1 Localisations préférentielles des tumeurs

Chez le chien les localisations préférentielles des tumeurs vésicales sont essentiellement le trigone et le col vésicaux, mais les tumeurs peuvent également siéger sur les parois ventrale, dorsale, l'apex, l'urètre proximal ou être diffuses. Dans l'étude de Knapp *et al.* (2000), la majorité des carcinomes transitionnels siégeaient en effet dans la région du trigone vésical. Cette localisation fait que les CCT sont souvent responsables d'une obstruction urétrale complète ou partielle à plus ou moins long terme.

Cela diffère de ce que l'on rencontre habituellement chez l'homme. En effet, les tumeurs peuvent se localiser sur la paroi latérale (37%), au niveau du trigone et du col (23%), sur la paroi postérieure (18%), ou à d'autres sites (22%) (Stephenson *et al.* 1990).

2 Architecture des tumeurs vésicales

L'architecture est un critère important d'interprétation des tumeurs transitionnelles chez l'homme. Chez l'homme plus de 90% des tumeurs ont une architecture papillaire.

Dans l'étude de Valli *et al.* (1995), effectuée sur 107 échantillons de carcinome vésicaux canins, 65% (72/107) d'entre eux présentaient une architecture plane ou laminaire, et 34% (37) une architecture papillaire.

L'étude de Valli *et al.* démontre également que chez le chien les lésions papillaires sont moins invasives que chez l'homme et ont tendance à devenir invasives à un stade plus tardif du développement tumoral (Valli *et al.*, 1995).

→ *Les caractéristiques morphologiques diffèrent un peu puisque chez l'homme il n'y a pas de localisation préférentielle alors que chez le chien les tumeurs siègent souvent au niveau du trigone vésical. D'autre part la plupart des CCT humains ont une architecture papillaire alors que seulement un tiers des CCT canins présentent ce type d'architecture.*

VI. COMPORTEMENT BIOLOGIQUE

1 Localisation et fréquence des extensions locorégionales et des métastases

1.1 Chez l'homme

L'existence de métastases ganglionnaires loco-régionales, au moment de la cystectomie, est corrélée au stade d'extension tumorale pariétale. Celles-ci sont observées plus souvent dans les tumeurs infiltrant la musculuse ou le tissu périvésical que dans les tumeurs pT1, et seraient trois fois plus fréquentes en cas d'infiltration macroscopique du tissu périvésical (pT3b) que lorsque celle-ci est microscopique (pT3a). L'existence de métastases ganglionnaires est un facteur de risque majeur de récurrence tumorale et modifie le pronostic (Renaudin *et al.*, 2002a).

D'après le rapport 2001 de l'Association Française d'Urologie, des métastases seraient présentes chez 7% des patients au moment du diagnostic (Chopin et Gattnegro, 2002).

Les sites métastatiques privilégiés des CCT sont le foie, les poumons et les os. D'autres sont plus rares comme le péritoine, la plèvre, les reins, les surrénales ou l'intestin. Enfin quelques localisations métastatiques exceptionnelles ont fait l'objet de rapports isolés : métastases musculaires, cutanées d'aspect inflammatoire, mammaires ou sinusales (Renaudin *et al.*, 2002a).

L'association d'une localisation prostatique à une tumeur vésicale existe dans 12 à 40 % des cas suivant les séries (Chopin et Gattnegro, 2002).

1.2 Chez le chien :

Les métastases de carcinomes transitionnels existent chez 11 à 37% des chiens au moment du diagnostic, selon les études (Henry *et al.*, 2003c). Par contre d'après Ogilvie et Moore (1997) elles seraient présentes chez 50% des chiens au diagnostic et 25% supplémentaires seraient diagnostiquées à l'autopsie. Dans l'étude de Knapp *et al.* (2000), qui ne concerne que des carcinomes transitionnels, les métastases régionales (nœuds lymphatiques) ou à distance étaient présentes respectivement dans 14 et 16% des cas au moment du diagnostic, contre 49% de métastases à distances au moment de la mort.

Les sites métastatiques privilégiés sont les ganglions locorégionaux et les poumons.

Les voies de dissémination des tumeurs vésicales sont constituées par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux nœuds lymphatiques locorégionaux, puis les cellules rejoignent la circulation générale par le canal thoracique. Lorsque les nœuds lymphatiques sont obstrués, les cellules tumorales sont directement déversées dans les vaisseaux sanguins, donc la voie hématogène intervient aussi. Une dissémination par invasion des structures adjacentes est possible, notamment au niveau du bas appareil urinaire, de l'appareil génital ou de la portion distale du tube digestif.

En ce qui concerne l'extension locorégionale, dans 56% des cas de CCT (étude sur 102 chiens) l'urètre est impliquée, et 29% des mâles présentent une infiltration de la prostate (Knapp *et al.*, 2000).

Les localisations des métastases sont les suivantes (d'après Knapp 2000 (sur 50 chiens atteints de CCT, à l'autopsie)) :

- Les nœuds lymphatiques locorégionaux constituent la localisation la plus fréquente (atteinte des nœuds lymphatiques sacraux, iliaques, hypogastriques et inguinaux, mais d'autres nœuds lymphatiques sont aussi souvent atteints). Ils seraient touchés dans 26% des cas à l'autopsie. (Knapp *et al.*, 2000)
- Et concernant les métastases à distance :
 - Les poumons : c'est la principale localisation des métastases à distance, 28% des chiens de l'étude de Knapp *et al.* (2000) présentaient des métastases pulmonaires à l'autopsie, contre 43% dans l'étude de Valli *et al.* (1995). Les lésions peuvent être nodulaire uniques ou multiples, diffuses, avec une distribution latéralisée ou bilatérale. Ces métastases sont souvent asymptomatiques. Les embolies pulmonaires peuvent parfois obturer les capillaires entraînant œdème pulmonaire interstitiel. Chez l'homme, ces embolies peuvent interrompre le drainage lymphatique sub-pleural aboutissant à une accumulation liquidienne passive, mais cela n'a pas été décrit chez le chien.
 - Autres localisations :
 - Foie (18%) (Knapp *et al.*, 2000)
 - Reins, Rate, Utérus, nœud lymphatique pré-scapulaire (4% chacun) (Knapp *et al.* 2000)
 - Nœuds lymphatiques mésentériques / bronchiques / rénaux, caecum, colon, squelette (vertèbres, bassin), paroi abdominale, diaphragme, muqueuse orale. (2% chacun). (Knapp *et al.*, 2000)
 - Cœur, moelle osseuse et urètre (4,7% chacun), Glande surrénale (11%), thyroïde, pancréas et ovaires (2%) (Valli *et al.*, 1995)

Enfin, Brodey *et al.* (1973) ont rapporté un cas d'ostéoarthropathie hypertrophique pulmonaire a été décrit chez un chien comme syndrome paranéoplasique associé à un CCT. Mais cela reste un phénomène rare.

→ *Les sites de développement des métastases sont similaires chez l'homme et le chien. Les métastases sont plus fréquentes chez le chien mais le diagnostic est aussi beaucoup plus tardif.*

2 Facteurs de progression et de pronostic

2.1 Chez l'homme

Chez l'homme, on fait la distinction entre tumeur superficielle et infiltrante pour définir le pronostic et le risque de progression.

2.1.1 Tumeurs superficielles :

Le pronostic est actuellement défini uniquement sur des critères clinico-pathologiques incluant : le type histologique, le grade, le stade, et la présence de carcinome in situ.

Il existe deux risques évolutifs : le risque de récurrence sans progression du stade et du grade de la tumeur, et le risque de progression tumorale dont le stade ultime est l'infiltration du muscle vésical voire la diffusion métastatique.

Le **stade** est l'élément essentiel du pronostic. Il a en effet été démontré depuis longtemps que l'infiltration pariétale était liée à la survie. Le pronostic est d'autant plus péjoratif que l'infiltration tumorale est profonde dans la paroi vésicale.

Le **grade** a surtout une valeur pronostique dans les tumeurs pTa. Une tumeur de faible potentiel de malignité (G1) a tendance à récidiver sur le même mode alors qu'une tumeur de haut grade (G3) récidive fréquemment mais surtout peut progresser.

Le *tableau 4 (page 49)* nous démontre l'influence du stade et du grade, facteurs pronostics importants, sur le taux de récurrence, le risque de progression, et le taux de décès liés à la tumeur.

Ainsi les risques de récurrence et de progression tumorale définissent deux sous groupes de cancers superficiels de la vessie. D'un côté les tumeurs Ta de bas grade, qui ont un risque de récurrence d'environ 5% dans les 5 ans, et un taux de progression de 5%, et de l'autre, les lésions Ta de haut grade, tous les T1, et les CIS, qui ont un risque de récurrence d'environ 50% dans les 5 ans et un de progression bien plus élevé. Le risque de progression est ensuite modulé par d'autres facteurs cités ci-dessous.

La présence de **CIS** associés à une tumeur papillaire assombrit le pronostic car il est source de récurrence et de progression. Ils accompagnent habituellement les tumeurs de haut grade.

Le **caractère multicentrique ou multifocal** et la **taille de la tumeur** influent également sur le pronostic. Le risque de récurrence est d'autant plus important que la tumeur est multifocale. La fréquence des récurrences varie selon les statistiques de 18% à 60% pour une tumeur unique et atteint 40% à 90% en cas de tumeur multiple. La taille de la tumeur est corrélée avec le stade et le risque de progression vers une infiltration musculaire : le risque de progression est de 35 % pour une tumeur de plus de 5 cm et de 9% pour une tumeur de plus petite taille.

L'**invasion vasculaire** (qu'il est possible de rencontrer sur une tumeur pT1) est un élément de mauvais pronostic et fait redouter l'apparition de métastases.

Enfin le **type histologique** semble devoir également être pris en compte. En effet, certains types histologiques seraient réputés pour leur mauvais pronostic: le carcinome micro-papillaire, le carcinome sarcomatoïde, et le carcinome neuro-endocrine à petites cellules. Mais les études n'ont pas démontré de différences significatives sur les temps de survie, et ceci confirme que le stade TNM prévaut sur le type histologique pour l'évaluation du pronostic (Sengupta et Blute 2006 ; Billerey et Sibony, 2001b).

Tableau 4 : Tumeurs superficielles de la vessie traitées par résection endoscopique, récurrence et progression (Suivi sur 20 ans) d'après Herr (Source : Chopin et Gattnego, 2002).

Tumeurs Stade / Grade	% de patients (20 ans de recul)		
	Récurrence superficielle	Progression de la tumeur	Décès par la tumeur
p Ta G1	59 %	14 %	14 %
p Ta G2 et G3	55 %	15 %	11 %
pT1 G2	49 %	32 %	22 %
pT1 G3	48 %	45 %	36 %
Moyenne	52 %	28 %	22 %

Enfin il existe d'autres facteurs qui influent sur l'espérance de vie et qui sont cités ci-dessous.

La **récurrence précoce**, c'est-à-dire avant la 3^{ème} mois suivant la résection complète d'une première tumeur, est un facteur prédictif du nombre des futures récurrences comme l'a mis en évidence Kurth, d'après Chopin et Gattnego (2002). Il explique que si le patient n'a pas récidivé à 3 mois, le

risque de développer au moins une récurrence ensuite est de 47%, contre 83% si au contraire il a récidivé avant 3 mois.

L'existence d'une **atteinte extra vésicale** aggrave significativement le pronostic. L'association d'une localisation prostatique à une tumeur vésicale aggrave le pronostic de la tumeur vésicale qui devient alors à haut risque évolutif. Le risque de localisation prostatique est majoré en cas de pTis multifocal et de tumeurs siégeant au niveau du col vésical et du trigone. (Chopin et Gattnegro 2002)

L'apparition d'une **atteinte du haut appareil urinaire** aggrave notablement le pronostic. En effet, 60% des atteintes tumorales urétérales ou pyelocalicelles sont invasives et peuvent entraîner un décès par métastases dans 37 % des cas. La réalisation d'une cystectomie permet cependant de diminuer ce risque de façon très significative (le risque passe alors à environ 8%). L'incidence de l'atteinte du haut appareil dépend directement du stade et du grade de la tumeur. Elle est d'autant plus fréquente que la durée d'évolution de la tumeur vésicale est élevée. Et la multifocalité de la tumeur vésicale est aussi un facteur important d'apparition d'une atteinte du haut appareil urinaire (Chopin et Gattnegro 2002).

Enfin, de **nombreux marqueurs** sont à l'étude, mais leur valeur pronostique indépendante n'a pas encore été établie. Ceux-ci seront sûrement utilisés dans l'avenir pour mieux évaluer le pronostic. Parmi eux, on trouve :

- Les **marqueurs de prolifération cellulaire**. Celle-ci est généralement augmentée par rapport aux cellules normales. Il est possible de l'évaluer de différentes façons : par cytométrie de flux (calcul du nombre de cellules en phase de synthèse de l'ADN), par microscopie optique (calcul de l'index mitotique ou du compte mitotique), ou par des méthodes d'immunohistochimie (détecter sur coupe histologique les cellules engagées dans le cycle cellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques tels que PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Ki-67 ou MIB-1). Dans les tumeurs urothéliales, il a été démontré que l'expression de Ki-67 est d'autant plus importante que la tumeur est de grade et de stade élevés (Billerey et Sibony, 2001b).
- Le **niveau de ploïdie**. Il exprime la quantité d'ADN du noyau des cellules tumorales. Il est très fortement corrélé au grade. Mais la technique doit être standardisée avant de pouvoir comparer les résultats des différentes études, et pouvoir ainsi utiliser ce facteur pour l'établissement du pronostic d'une tumeur vésicale (Billerey et Sibony, 2001b).
- Les **marqueurs du cycle cellulaire**, notamment p53. L'altération de la fonction de p53 a été démontrée dans de nombreuses tumeurs, mais dans les tumeurs vésicales, les résultats sont controversés. Des études ont montré qu'il existait une corrélation entre l'expression de p53 par immunohistochimie, le grade cytologique et le stade alors que d'autres ne l'ont pas retrouvée. Son intérêt pronostique a également été étudié : sa forte expression nucléaire serait un facteur péjoratif en terme de récurrence et de décès (voir VII. 1) (Billerey et Sibony, 2001b). D'autre part, un gène souvent altéré est le gène *Rb*. Et récemment un intérêt particulier s'est focalisé sur les inhibiteurs des cyclines en particulier *p16*, *p27* et *p15* (Chopin et Gattnegro, 2002).
- Les **autres marqueurs** (Billerey et Sibony, 2001b ; Chopin et Gattnegro, 2002) :
 - o La cytokératine 20, un marqueur cytoplasmique qui serait exprimé dans des tumeurs urothéliales bien différenciées (papillome et tumeurs de bas grade).
 - o En ce qui concerne les oncogènes, les altérations concernent :
 - L'oncogène RAS : seul un polymorphisme de certains allèles a été mis en évidence.
 - Récemment, certaines mutations du FGFR3, mutations activatrices, ont été mises en évidence dans un pourcentage élevé de tumeurs superficielles de la vessie. Des études sont en cours sur l'incidence et la signification de ces mutations. Elles tendent à montrer que la mutation de FGFR3 (Récepteur 3 du Fibroblast Growth Factor) est plus fréquente dans les tumeurs de stade pTa que dans les carcinomes infiltrants et qu'elle serait par ailleurs d'autant plus fréquente que le grade est faible.

- Les antigènes de groupes sanguins : L'absence de marquage de ces antigènes a été constatée plus fréquemment chez des patients ayant un cancer agressif et/ou infiltrant.
- Les modifications chromosomiques : La perte d'une partie ou de tout le chromosome 9 ; délétion du 11, duplication de 3p, isochromosome 5p.
- L'activation des proto-oncogènes c-erbB-1, c-erbB-2.

2.1.2 Tumeurs invasives :

Pour les carcinomes infiltrant au moins le muscle vésical (soit d'emblée, soit au cours d'une récurrence de tumeur pTa ou pT1), le pronostic semble dépendre essentiellement du **stade pTNM** (Renaudin *et al.*, 2002b).

D'après Renaudin *et al.* (2002b), l'étude d'Hara *et al.* rapporte en effet que le **taux de survie à 5 ans** après cystectomie diminue significativement en fonction du stade : il est de 77,9% pour les pT2, de 45% pour les pT3 et de 29,2% pour les pT4. Tous stades confondus, la présence de métastases ganglionnaires fait passer ce taux de 76,5% à 22,7%.

D'après Renaudin *et al.* (2002b), une autre étude de Cheng *et al.* démontre qu'en plus du stade tumoral et des métastases ganglionnaires, la taille de la tumeur (< ou > à 3 cm), et l'existence de marges chirurgicales sont corrélées à la survie liée au cancer.

2.2 **Chez le chien**

Le CCT du chien est très difficile à traiter. Les principaux facteurs qui vont faire varier le temps de survie sont ceux qui vont influencer sur la réponse au traitement. Ainsi les facteurs qui compromettent une bonne réponse au traitement sont : un **stade** avancé au moment du diagnostic, une **localisation anatomique** qui empêche une exérèse chirurgicale complète ou une diminution significative de la taille de la tumeur, et **l'efficacité limitée de la chimiothérapie** et des protocoles standard **de radiothérapie** (Norris *et al.*, 1992). Au contraire les facteurs qui influencent positivement le pronostic sont une localisation de la tumeur qui rend possible l'exérèse chirurgicale, **l'absence d'atteinte concomitante de la vessie et de l'urètre** (Norris *et al.*, 1992, Rocha *et al.*, 2000)

Rocha *et al.* sont les premiers à rapporter un temps de survie plus long chez les femelles. Ils précisent cependant qu'une étude comprenant plus de mâle est nécessaire pour confirmer cette constatation. Cela pourrait s'expliquer d'après l'auteur par le fait que le tractus urinaire est plus court chez la femelle et présente moins de contraintes anatomiques comparé au mâle (prostate, pénis), ce qui peut permettre une extension tumorale importante avec seulement des changements minimes dans les signes cliniques urinaires. D'autre part il serait possible qu'un facteur hormonal influence le comportement de la tumeur, sa progression, et la réponse à la chimiothérapie (Rocha *et al.*, 2000).

Dans leur étude, Rocha *et al.* ne sont pas parvenu à mettre en évidence de corrélation entre diverses variables histologiques (degré d'invasion de la paroi, grade, invasion lymphatique) et le temps de survie. Ils ont tout de même mis en évidence une tendance à un temps de survie diminué chez les chiens présentant une tumeur de plus haut **grade**. Ils ont aussi recherché, par analogie avec ce qui est connu chez l'homme, la présence de marqueurs de résistance à la chimiothérapie (la glycoprotéine-P, et la glutathion-S- transférase π) ainsi que d'un facteur d'angiogénèse (le facteur VIII) mais n'ont pas non plus trouvé de signification pronostique. Cela serait dû d'après l'auteur, dans les deux cas, à un nombre de cas insuffisant.

En effet, une étude récente, issue du « Proceedings of the 19th Annual Veterinary Cancer Society Conference », effectuée par Knapp *et al.* en 1999 (rapportée dans Henry, 2003a), démontre clairement une corrélation entre le **stade TNM** et le pronostic.

Les temps de survies rapportées dans le *tableau 5*.

Tableau 5 : Temps moyen de survie en fonction du stade TNM de la tumeur chez le chien. (Données issue du « *Proceedings of the 19th Annual Veterinary Cancer Society Conference* », effectuée par Knapp et al en 1999 (rapportée dans Henry, 2003a))

Stade au moment du diagnostic	Stade T		Stade N		Stade M	
	T1 ou T2	T3	N0	N1	M0	M1
Médiane de survie en jour	218	118	234	70	203	105

Valli *et al.* (1995) ont constaté qu'il y avait aussi une corrélation significative entre le **grade tumoral** et la survie. En effet, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les grades 2 et 3, ils ont constaté que le temps de survie des chiens avec une tumeur de grade 2 ou 3 était significativement plus court que celui des chiens avec une tumeur de grade 1.

→ *Il est difficile de comparer des données qui sont si différentes (taux de survie à 5 ou 20 ans chez l'homme, contre la médiane de survie pour le chien). Cependant il est important de noter la similitude des principaux facteurs qui influent sur le pronostic. Ainsi dans les deux espèces, le pronostic est essentiellement corrélé au stade et au grade de la tumeur et à la réponse à la thérapie initiale.*

VII. ANOMALIES MOLECULAIRES COMMUNES

La transformation d'une cellule normale en cellule maligne est un mécanisme comprenant plusieurs étapes, qui inclut des altérations variées au niveau moléculaire et génétique.

Chez l'homme ces altérations ont été très étudiées. Ainsi l'expression d'un certain nombre de gènes est altérée, essentiellement par des mutations ou des aberrations chromosomiques :

- des oncogènes : ras (*mutation du gène Ha-ras*), erbB-2 (*surexpression*), et le récepteur à l'EGF (*surexpression*),
- des gènes suppresseurs de tumeurs (Rb, p53),
- des gènes du cycle cellulaire (p15, p16)
- et des gènes de réparation de l'ADN

Il a aussi été démontré que la perte de l'hétérozygotie des chromosomes 9p et 9q était un événement crucial dans la transition entre l'urothélium normal et le CCT papillaire, alors que p53 serait impliqué essentiellement dans le développement de carcinomes *in situ* (Brandau et Böhle, 2001).

Il est indispensable de définir les altérations moléculaires rencontrées dans les CCT chez le chien par analogie avec celles connues chez l'homme, dans l'objectif de valider le cancer de vessie du chien comme modèle pour l'homme et de proposer des thérapeutiques expérimentales qui soient ensuite transposables. Ainsi dans cette partie nous ne détaillerons pas toutes les altérations moléculaires et génétiques connues chez l'homme, mais nous nous intéresserons uniquement à ceux qui ont été étudiés à la fois chez l'homme et chez le chien.

1 Altération du gène suppresseur de tumeur p53

Il existe deux types de gènes régulateurs de la croissance cellulaire : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Le gène le plus altéré dans les cancers humains est le gène p53. Il code pour une phosphoprotéine nucléaire qui est un modulateur de la prolifération cellulaire en réponse à des stress génomiques variés. La protéine p53 a un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN, et dans

l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose). Son expression augmente quand l'ADN est altéré.

Une altération du gène p53 va avoir pour conséquence une perte de sa fonction, ou l'acquisition de fonctions anormales par ses protéines produites, et cela pourrait contribuer à la prolifération cellulaire incontrôlée. On constate notamment une surexpression de la protéine quand le gène est altéré.

Le fait que la protéine p53 soit mutée la rend détectable, et plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : (Gamblin *et al.*, 1997)

- la courte durée de vie de la protéine p53 sauvage empêcherait toute détection,
- la mutation pourrait induire une conformation de la protéine différente qui la rendrait détectable,
- l'accumulation de p53 sauvage dans les cellules tumorales pourrait être due à sa liaison avec d'autres protéines, ce qui la stabiliserait et la rendrait détectable.

1.1 Chez l'homme :

Des études d'immunoréactivité histochemique permettent de mettre en évidence une surexpression de la protéine de p53 (donc une mutation du gène p53) dans les cellules tumorales. Cette surexpression est fréquente ; ainsi dans une étude récente de Vardar *et al.* (2006), 61% des patients (60/99) atteints de CCT surexprimaient p53. D'autres auteurs ont rapporté une surexpression chez 22 à 64% des CCT, suivant les études (Vardar *et al.*, 2006).

La détection d'une surexpression de p53 est d'une grande utilité clinique chez l'homme car elle peut être corrélée avec le pronostic. Ainsi, dans le cas des cancers de la vessie, deux études, réalisées par Esrig D en 1993 et 1994 (Gamblin *et al.*, 1997) ont permis de corréler la surexpression immunohistochemique de la protéine p53 avec la progression clinique, et le temps de survie des patients atteints de carcinomes transitionnels de la vessie : en effet, d'après Esrig (dans Gamblin *et al.*, 1997) une surexpression de p53 indiquerait un risque accru de récives après exérèse chirurgicale et un temps de survie plus court. Une étude plus récente de Vardar *et al.* (2006) a démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la récive et la surexpression de p53, mais que cette surexpression de p53 avait une valeur prédictive pour déterminer la progression tumorale. Ils ont aussi constaté une fréquence plus importante de cette surexpression dans les tumeurs de haut grade mais la différence n'était pas significative.

La surexpression de p53 est donc un indicateur de mauvais pronostic dans le carcinome transitionnel de la vessie chez l'homme et doit faire envisager des thérapies plus radicales, en prenant bien sûr en compte les autres paramètres pronostiques (Vardar *et al.*, 2006).

1.2 Chez le chien :

Dans une étude réalisée par Gamblin *et al.* en 1997, visant à évaluer la surexpression de p53 dans plusieurs groupes de néoplasmes canins, avec un anticorps monoclonal (CM-1) dirigée contre p53 humaine et par une méthode de détection immunohistochemique, il s'est avéré qu'aucun carcinome transitionnel n'était positif, contrairement à ce qu'on retrouve chez l'homme. Par ailleurs cette étude a démontré que la surexpression de p53 était commune dans de nombreux autres types de néoplasmes canins (Gamblin *et al.*, 1997).

Cependant Gamblin *et al.* précisent qu'il est possible d'obtenir de faux négatifs pour plusieurs raisons :

- si le gène est muté, la protéine pourrait être non reconnue, voire non synthétisée,
- si la mutation induit une protéine qui n'est pas assez stabilisée pour la détection immunohistochemique.

D'autre part les auteurs précisent qu'au lieu d'un seul AC, il aurait peut être fallut utiliser plusieurs AC-anti p53, et si possible, des AC dirigés contre la protéine p53 canine (même si p53 est très similaire dans sa séquence ADN chez l'homme et le chien).

Des résultats opposés ont été obtenus par Knapp et Lin (donnée non publiée, citée dans Knapp *et al.*, 2000) : un petit nombre d'échantillons de carcinomes transitionnels examinés dans leur laboratoire ont présenté une immunoréactivité marquée aux AC-anti p53. Une lignée de cellules de carcinome transitionnel canin a présenté également une immunoréactivité pour les AC p53 au Western Blot (Knapp et Coffman, donnée non publiée, citée dans Knapp *et al.*, 2000)

2 Les facteurs pro-angiogéniques et facteurs de croissance

2.1 Le Basic Fibroblast Growth Factor :

Le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) est un peptide proangiogénique puissant qui a été retrouvé à de fortes concentrations dans l'urine des humains atteints de cancers urothéliaux ou non-urothéliaux. (Knapp *et al.*, 2000). Il favorise la progression tumorale.

D'après Allen *et al.* (1996) la concentration en bFGF dans les urines de chiens atteints de carcinomes transitionnels est significativement plus élevée que chez les chiens présentant une cystite bactérienne. Chez la plupart des chiens avec carcinome transitionnel, la concentration en bFGF était sept fois plus élevée que chez les chiens sains (Allen *et al.*, 1996). De même Mohammed *et al.* (2002) ont trouvé une concentration urinaire moyenne de 7 +/- 8,2 ng/g de créatinine chez 14 chiens atteints de CCT, contre une moyenne de 0.31 +/- 0.61 ng/g de créatinine obtenue chez 8 chiens normaux.

La principale hypothèse est que le bFGF retrouvé en grande quantité dans les urines proviendrait du bFGF dérivé des cellules tumorales qui est éliminé de la circulation sanguine par filtration glomérulaire (Allen *et al.*, 1996).

D'après les auteurs, le bFGF pourrait servir de marqueur tumoral de diagnostic pour différencier les chiens avec simple infection urinaire des chiens atteints de CCT, mais d'autres études sont nécessaires pour savoir si le dépistage de chiens âgés pourrait permettre un diagnostic précoce de cancer de la vessie (Allen *et al.*, 1996).

2.2 Le Vascular Endothelial Growth Factor

Mohammed *et al.* (2002) ont étudié au cours d'un essai de traitement à base de piroxicam, les concentrations en VEGF de 13 chiens atteints de CCT. La concentration moyenne de VEGF dans les urines chez ces chiens avant tout traitement était de 1509.5 +/- 657.6 ng/g de créatinine, ce qui est trois fois plus élevé que la concentration urinaire en VEGF trouvée chez 11 chiens normaux (494.32 +/- 233.95 ng/g de créatinine).

Cette constatation constitue donc un autre point commun avec le CCT de l'homme.

2.3 Autres

D'autres facteurs angiogéniques sont importants dans le carcinome transitionnel de l'homme, mais tous n'ont pas encore été étudiés chez le chien.

Notamment une surexpression du récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor) : FGFR3 a été détecté chez 76 à 83% des tumeurs pTa, 47 à 100% des pT1, et 50% des pT2. On la rencontre donc plus fréquemment dans les tumeurs de stade peu avancé. La surexpression est par ailleurs plus fréquente dans les tumeurs bien différenciées (88% des G1, 62% des G2, 63% des G3). Tout ceci indique un rôle au début du développement des néoplasies urothéliales. (Mhawech-Fauceglia *et al.*, 2006) L'expression du FGFR3 n'a pas encore été étudiée chez le chien.

3 Surexpression de la cyclooxygénase-2 (COX-2)

C'est suite à l'observation de rémissions de CCT spontanés canins et de CCT chimio-induits murins consécutivement à l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (piroxicam), que des recherches ont été effectuées pour évaluer l'expression des cyclooxygénases au niveau des cellules tumorales et étudier leur éventuel rôle dans la progression tumorale.

Il existe deux isoenzymes :

- COX-1, qui est exprimée de façon ubiquitaire. Elle est impliquée dans la production de prostaglandines qui modulent les fonctions physiologiques normales de divers organes tels que les reins, le tube digestif, les plaquettes.
- COX-2, dont l'expression est principalement induite lors d'une inflammation. Elle est impliquée dans la production de prostaglandines modulant des phénomènes physiologiques intervenant dans le développement, la croissance cellulaire et l'inflammation.

Le rôle potentiel de COX-2 sur la croissance des cellules tumorales inclurait des effets directs sur la prolifération cellulaire, ou des effets indirects secondaires à la libération d'autres cytokines. Certains auteurs suggèrent que COX-2 pourrait être impliquée dans le développement de néocapillaires au sein de la tumeur, cependant dans l'étude de Khan *et al.* (2000), à l'exception de 3 cas, COX-2 n'a pas été détectée dans la vascularisation tumorale. Il est possible aussi que les prostaglandines, médiées par COX-2, puissent jouer un rôle vasodilatateur au sein des tumeurs.

Des recherches sont encore en cours actuellement pour identifier précisément les mécanismes cellulaires responsable de l'effet anti-tumoral exercé par les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

➤ Chez le chien :

Une étude a été réalisée par Khan *et al.* (2000), à l'aide d'anticorps spécifiques des deux isoformes et par des méthodes d'immunohistochimie standard, sur 21 chiens atteints de CCT, et huit chiens témoins. Il a été observé que COX-1 était constitutivement exprimée dans les huit échantillons d'épithélium urinaire normal, ainsi que dans les sept échantillons d'épithélium normal prélevé à proximité de la tumeur. De façon similaire, ils ont observé que COX-1 était aussi exprimé par les cellules néoplasiques (Khan *et al.*, 2000).

Ensuite il a été constaté une immunoréactivité à COX-2, modérée à élevée, au niveau des cellules de l'épithélium néoplasique des tumeurs primitives (chez tous les chiens) ainsi que dans les lésions métastatiques de tous les chiens, et dans les cellules endothéliales des néovaisseaux se développant au sein de la tumeur chez trois chiens. Le pourcentages de cellules prenant la coloration était en moyenne de 56,7% (+/- 24,9%) au niveau de la tumeur primitive et de 44,3% au niveau des métastases (+/- 23,7%) (Khan *et al.*, 2000).

Une étude réalisée sur 18 CCT canins par Knottenbelt *et al.* (2006) obtient des résultats similaires : tous les carcinomes transitionnels étaient positifs à COX-1 et à COX-2. Par contre dans cette étude, l'intensité de la coloration était plutôt faible : seuls 17 % des échantillons présentaient un pourcentage de cellule colorées supérieur à 30% (Knottenbelt *et al.*, 2006).

Cette absence de COX-2 au sein de l'épithélium normal et son expression importante dans les cellules de CCT suggèrent que cet isoforme pourrait en effet être impliqué dans la croissance cellulaire tumorale (Khan *et al.*, 2000).

➤ Chez l'homme :

Une expression notable de COX-2 a déjà été mise en évidence dans divers cancers tels que les carcinomes du colon, du sein, et des poumons.

Mohammed *et al.* ont réalisé en 1999 une étude visant à caractériser l'expression de COX-1 et COX-2 dans les CCT invasifs, non invasifs, et les CIS (qui sont considérés comme des stades précurseurs de CCT invasifs), chez l'homme, par une méthode d'immunohistochimie. Une immunoréactivité positive à COX-2 a été mise en évidence dans 25 des 29 échantillons de CCT invasifs (soit 86%), 7 des 9 échantillons de CCT non invasifs (soit 78%), et 6 des 8 échantillons de CIS (soit 75%). Il a par contre été constaté une grande hétérogénéité dans le pourcentage de cellules positives à COX-2, entre les différents échantillons (Mohammed *et al.*, 1999).

Il a aussi été observé une immunoréactivité dans la moitié des coupes d'épithélium normal mais adjacent à la tumeur. Cela pourrait s'expliquer par la théorie de « l'effet champ » : l'exposition à des carcinogènes dans les urines aurait pour conséquence des changements biochimiques et une initiation tumorale au sein de l'ensemble de l'urothélium (les cellules ont un aspect normal mais ont acquis les mutations et les changements biochimiques identiques à ceux retrouvés au niveau des cellules tumorales). Une autre hypothèse possible est que l'augmentation de COX-2 dans l'épithélium normal adjacent à la tumeur indiquerait que les cellules tumorales exercent un effet paracrine par la libération de cytokines et/ou de facteurs de croissance (Mohammed *et al.*, 1999).

Ainsi chez l'homme comme chez le chien une surexpression de COX-2 est constatée dans les CCT, en opposition à une absence d'expression dans l'urothélium sain. COX-2 pourrait alors être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers invasifs de la vessie (Mohammed *et al.*, 1999).

→ *Le CCT de l'homme et du chien présentent des similitudes dans leurs anomalies moléculaires. Cependant il reste à rechercher si les autres anomalies génétiques et moléculaires sont aussi rencontrées dans les CCT canins, à confirmer ou infirmer une surexpression de p53 par les CCT canins, et à rechercher une éventuelle corrélation avec le grade.*

VIII. REPONSES AUX TRAITEMENTS CONVENTIONNELS

Cette partie vise tout d'abord à mettre en évidence des similitudes dans les réponses des tumeurs vésicales du chien et de l'homme face aux traitements conventionnels, mais aussi de démontrer les limites de ces traitements actuels, pour mettre en exergue la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1 Chez l'homme

Chez l'homme la conduite thérapeutique va tout d'abord dépendre de la nature superficielle ou infiltrante de la tumeur. Le *tableau 6* page 64 représente un tableau résumant les choix thérapeutiques en fonction du stade TNM.

1.1 Traitement des cancers superficiels de la vessie

Comme nous l'avons vu précédemment, les cancers dits « superficiels » de la vessie, englobent les stades Ta, Tis (ou CIS), et T1 (invasion de la lamina propria), et représentent environ 75% de l'ensemble des tumeurs vésicales.

Le grade a également son importance dans le choix du traitement. Il est donc nécessaire de distinguer les tumeurs de bas grade, et celles de haut grade, ces dernières représentant environ 25% des tumeurs Ta, la majorité des tumeurs T1, et tous les CIS.

Le caractère « agressif » du traitement va en effet dépendre des risques de récurrence et de progression tumorale. Or, comme nous l'avons vu précédemment, le risque de récurrence et de progression tumorale définit deux sous groupes de cancers superficiels de la vessie :

- d'un coté les tumeurs Ta de bas grade,
- de l'autre les lésions Ta de haut grade, les T1, et les CIS.

Le risque de progression est aussi modulé par d'autres facteurs tels que le nombre et la taille des lésions, la coexistence de CIS avec les tumeurs et la réponse à la thérapie initiale.

Ainsi les patients atteints de carcinomes transitionnels à haut risque meurent de leur cancer dans 10 à 40% des cas et nécessitent donc la mise en place d'une thérapeutique agressive (Sengupta et Blute, 2006).

1.1.1 Résection transurétrale vésicale (RTUV)

Chez la plupart des patients avec des cancers superficiels de la vessie, la tumeur peut être résecuée. La résection endoscopique reste la méthode de biopsie et le traitement de référence de toutes les tumeurs superficielles de la vessie.

Cependant, cette technique présente des inconvénients et des limites. Tout d'abord il existe un risque d'essaimage et de greffes des cellules tumorales vésicales au cours de la procédure (Chopin et Gattnego, 2002). De plus, malgré la résection complète, deux tiers des patients vont développer une récurrence dans les 5 ans. Et dans les 15 ans, 88% des patients auront récidivé (Perabo et Muller, 2004).

Une deuxième résection biopsie va permettre de réaliser l'ablation d'une tumeur résiduelle et de modifier éventuellement le stade ou le grade défini initialement.

Le risque de progression d'une tumeur envahissant le muscle atteint 50 à 80%. De plus 20% des patients avec Tis diffus et 10 % des patients avec Tis focal présentent respectivement des signes d'invasion musculaire ou des métastases régionales occultes lors de l'examen histopathologique final, lorsqu'ils sont finalement traités par cystectomie radicale (Perabo et Muller, 2004).

Tout ceci prouve la nécessité de mettre en place des traitements adjuvants à la RTUV.

1.1.2 Traitements adjuvants à la résection transurétrale vésicale

- Indications :

Les récurrences et la progression potentielles des tumeurs vésicales fournissent une bonne raison d'instituer une thérapeutique prophylactique. Les agents thérapeutiques peuvent être instillés directement dans la vessie par l'intermédiaire d'un cathéter, évitant ainsi les effets délétères d'une administration par voie systémique. Le comportement supposé de la tumeur d'un patient donné reste un facteur déterminant dans la décision d'entreprendre une thérapie intravésicale ou non (Perabo et Muller, 2004).

Etant donné l'absence de facteurs de risques de progression, la thérapie intravésicale n'est pas nécessaire pour les tumeurs Ta de grade 1, car elles n'ont un taux de progression que de 2 à 4%. En revanche, une affection Ta multifocale, quelque en soit le grade, est associée à un risque accru de récurrence et/ou de progression tumorale, et constitue donc une indication pour les thérapies adjuvantes intravésicales. La présence de foyers de Tis, même petits, devrait aussi être considérée comme une indication de thérapie intravésicale (Perabo et Müller, 2004).

D'autres indications sont les affections Ta de bas grade récidivant dans les 2 ans : trois mois après la 1^{ère} résection, un contrôle cystoscopique est effectué. Si la tumeur a récidivé, une deuxième

RTUV est réalisée, associée à un traitement adjuvant. Enfin les instillations endovésicales sont aussi recommandées dans les cas de cytologies urinaires positives persistantes et localisées à la vessie et dans les cas d'atypies cellulaires sévères (Perabo et Müller, 2004).

- L'immunothérapie intravésicale :

L'agent le plus fréquemment utilisé à l'heure actuelle est le **BCG** (Bacille de Calmette et Guérin), ainsi qu'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*. Ils se sont montrés efficaces à la fois pour la thérapeutique et la prophylaxie.

Bien que la BCG thérapie ait été très étudiée du point de vue du dosage, du protocole et du mode d'administration, elle ne reste pas dépourvue d'effets secondaires qui peuvent altérer la qualité de vie de façon significative. De plus, son utilisation a montré certaines limites notamment dans le cas des Tis et des tumeurs réfractaires. C'est pourquoi d'autres stratégies immunothérapeutiques doivent être envisagées (Perabo et Müller, 2004).

La BCG-thérapie sera développée plus en détails dans la 3^{ème} partie, qui porte sur l'immunothérapie dans le traitement des tumeurs vésicales chez l'homme.

- La chimiothérapie intravésicale : (Chopin et Gattnego, 2002)

Il existe différentes façons d'utiliser la chimiothérapie intravésicale : la chimio-résection, et la chimioprophylaxie : en entretien, ou sous forme d'instillations post opératoires précoces..

Tout d'abord la chimiothérapie peut être utilisée sous forme de **chimio-résection** pour l'éradication de tumeurs en place. Dans le cadre du carcinome *in situ*, la Mitomycine C apporte des taux de réponse de l'ordre de 50 %, et n'est donc pas le traitement de première ligne. La chimiothérapie a aussi été utilisée de façon palliative dans les tumeurs pTa et pT1 non réséquées complètement, mais avec de très mauvais résultats.

Mais la chimiothérapie endovésicale est principalement utilisée dans le cadre de la **prophylaxie** après résection complète, avec pour objectif de diminuer les récurrences. D'après Chopin et Gattnego (2002), l'efficacité sur la diminution de la récurrence est diversement appréciée (15 % par Lamm et 38 % par Huncharek dans une méta analyse publiée récemment), mais d'après cet article, l'ensemble des auteurs s'accorde cependant à dire qu'il n'y a pas d'intérêt à utiliser un traitement d'entretien avec la chimiothérapie.

Les instillations post-opératoires précoces consistent en l'utilisation d'instillation dans les 24 premières heures qui suivent la résection en l'absence d'hémorragie post opératoire importante. Celles-ci ont un effet sur l'implantation tumorale et diminuent les récurrences la première année. La substance la plus utilisée actuellement est la Mitomycine C, cependant parmi les Antracyclines, l'Epuribicine a été très utilisée, et la Mitoxantrone est également à l'étude.

La Mitomycine C diminue le risque de récurrence mais n'a pas d'effet sur la progression. Ses indications sont avant tout les tumeurs de risque intermédiaire ou les tumeurs initialement à faible risque ayant récidivé. Dans les études randomisées, l'effet sur la récurrence des instillations post-opératoires précoces est inférieur à celles d'un cycle de chimiothérapie complet mais la différence n'est pas significative. Il n'y a donc pas d'intérêt à faire un traitement d'entretien.

→ *La RTUV présente des limites, et les récurrences fréquentes indiquent la nécessité d'un traitement adjuvant. Pour les tumeurs pTa on préfère en générale utiliser la mitomycine C, tandis que pour les tumeurs pT1 on préfère le BCG. De nombreuses études s'accordent à dire que le traitement au BCG est globalement plus efficace qu'une chimiothérapie intravésicale.*

→ L'objectif de ces traitements adjuvants est de traiter la maladie résiduelle après résection complète en particulier dans les tumeurs à risque intermédiaire et à haut risque. La chimiothérapie permet la réduction des récives donc des gestes de résection et l'utilisation du BCG a permis de retarder la progression dans les tumeurs à haut risque. A côté de ce bénéfice, il existe des complications et des inconvénients nombreux liés aux instillations.

1.1.3 La cystectomie

La cystectomie est mise en œuvre lors des échecs des traitements conservateurs pour les tumeurs à haut risque.

La survie après cystectomie pour les tumeurs superficielle de la vessie dépend du stade. Globalement, la survie des CIS est supérieure à 80% à 5 et 10 ans et celle des pT1 est d'environ 70%.

Le moment de la cystectomie est très important. D'après Chopin et Gattnego (2002), Herr a démontré que sur une tumeur à haut risque traitée au BCG et qui récidive sans progresser, le taux de survie à 15 ans passe de 92% si elle est réalisée avant 2 ans, à 56% si elle est réalisée après 2 ans.

La cystectomie de référence est une prostatocystectomie avec ou sans remplacement vésical. L'urétréctomie est indiquée en cas de localisation urétrale ou d'atteinte de la prostate (Chopin et Gattnego 2002).

1.2 **Cancer infiltrant de la vessie, et cancer métastaté**

Le choix du traitement à mettre en œuvre est primordial pour les cancers infiltrants de la vessie car ceux-ci peuvent potentiellement mettre en jeu le pronostic vital du patient.

1.2.1 Traitement chirurgical

➤ Indications :

La cystectomie totale est le traitement de référence des tumeurs infiltrantes de haut grade, non métastatiques et des tumeurs superficielles ayant résisté au traitement par immunothérapie ou par chimiothérapie endovésicale.

Une partie des patients présentant une invasion du muscle peuvent tout de même être traités efficacement sans passer par une cystectomie radicale, cela inclue :

- les petites lésions isolées avec une invasion musculaire uniquement focale
- les tumeurs complètement résécables par RTUV.
- les tumeurs localisées à distance des jonctions urétéro-vésicales et du col vésical
- les tumeurs sans CIS diffus ou sans hydronéphrose associée.

Ces patients peuvent être traités par RTUV, cystectomie partielle, ou radiochimiothérapie.

➤ Résultats :

Le taux de réussite dépend du stade TNM. D'après Bouchot et Zerbib (2002), les taux de survie à 5 ans après cystectomie totale (dans les séries après 1980) sont les suivants :

- Pour tous stades pT et pN0, les survies globale et spécifique varient de 48 à 68%.
- Pour les stades \leq pT2b pN0, les survies globale et spécifique varient de 53 à 89%.
- Pour les stades \geq pT3a pN0 (sans extension pT4b), les survies globale et spécifique varient de 31 à 71%.
- Pour une tumeur superficielle ayant résisté aux traitements locaux, les survies globale et spécifique varient de 74 à 100%.



D'après Dinney (2006), les patients présentant un cancer de la vessie confiné à l'organe, et ce avec confirmation lors de l'analyse histologique, ont un taux de survie sans récurrence à 5 ans de 75 à 80% après cystectomie radicale et lymphadénectomie pelvienne. Ce taux chute à 50% pour les patients avec un stade plus avancé.

D'après Bouchot et Zerbib (2002), il existe un consensus pour réaliser une cystectomie totale chez les patients présentant un envahissement ganglionnaire modéré. La cystectomie totale avec curage ilio-obturateur bilatéral est bénéfique pour un certain nombre de patients pN1 avec un pourcentage global de survie à 5 ans d'environ 25%.

Les résultats de la chirurgie seule pour les tumeurs avec extension extravésicale (cT3b/T4a), invasion lymphovasculaire, ou des caractéristiques défavorables sarcomatoïdes ou micropapillaires, sont décevants : on constate en effet une forte proportion de métastases occultes dans les nœuds lymphatiques (35 à 40%) et un taux de guérison de seulement 20 à 30% avec la chirurgie seule (Dinney, 2006).

Le délai entre le diagnostic et la cystectomie est aussi en jeu (Dinney, 2006). Des récurrences sont possibles après cystectomie totale. Concernant le haut appareil urinaire, l'incidence des tumeurs pyélocalicielles et urétérales a été évaluée de 1% à 9%, en majorité dans les 3 premières années suivant la cystectomie totale. La fréquence de la récurrence urétrale est comprise entre 4 et 15 %. Et le pourcentage des récurrences pelviennes, est actuellement compris entre 5% et 18% avec un taux moyen de 11.56%, d'où l'intérêt d'associer la lymphadénectomie à la cystectomie.

➤ Risques liés à cette intervention :

Tout d'abord l'âge ne semble pas être une contre indication systématique à la cystectomie totale, mais c'est plutôt un score ASA < III qui serait déterminant (ASA : American Society of Anesthesiology, qualifie le risque anesthésique du patient).

Les risques ont tout de même bien diminué par rapport aux séries plus anciennes décrites dans la littérature. Ainsi la mortalité per-opératoire est inférieure à 1%. La mortalité post-opératoire précoce (< 30 jours) est inférieure à 4% dans les séries les plus récentes. Enfin la morbidité précoce peut atteindre 35% dans certaines séries. Elle est alors dominée par les complications médicales liées à l'acte chirurgical et au terrain (ASA > III), mais aussi d'ordre chirurgical : iléus prolongé, fistules anastomotiques, infections systémiques et pariétales. La morbidité tardive (> 3 mois) peut atteindre jusqu'à 30%. Elle est dominée par les sténoses urétéro-intestinales et la détérioration au long cours de la fonction rénale (Bouchot et Zerbib, 2002).

D'autre part, la qualité de vie est souvent altérée puisque lors de la mise en place d'une vessie de remplacement, la continence urinaire diurne est conservée chez 83,7 à 97% des patients suivant les techniques, mais la continence nocturne n'est conservée que chez 66,3 à 95% des patients (suivant la technique employée) (Bouchot et Zerbib, 2002).

Enfin, concernant le risque carcinologique, différents facteurs entrent en jeu dans le résultat obtenu après cystectomie. De nombreuses études ont permis de constater que les taux de survie augmentaient après une lymphadénectomie étendue, même lorsque les nœuds lymphatiques ne présentaient pas de signes de métastases à l'analyse histologique. Les taux de survie plus importants sont généralement attribués à une résection chirurgicale plus complète des métastases occultes.

→ *La cystectomie radicale est pour le moment le traitement de choix pour les tumeurs envahissant la paroi musculaire.*

1.2.2 Chimiothérapie peri-opératoire dans le cadre d'une cystectomie radicale

➤ Indications et intérêt :

La polychimiothérapie semble améliorer les résultats chez les patients pour lesquels la chirurgie seule est peu susceptible de suffire pour guérir le cancer. D'autre part, les échecs d'une thérapie locale surviennent le plus souvent à distance et sont liés à la présence de micrométastases non détectables cliniquement. D'après Bouchot et Zerbib (2002), l'analyse des résultats des essais randomisés de phase III concernant la chimiothérapie adjuvante après cystectomie, montre une augmentation du temps sans progression pour les tumeurs infiltrantes localement avancées, mais la chimiothérapie adjuvante n'apporterait pas de bénéfice sur la survie globale des patients.

Dans une série de patients attentivement sélectionnés, et présentant des caractéristiques de tumeur à haut risque, traités au MD Anderson Cancer Center (Millikan *et al.*, 2001 dans Dinney, 2006), il a été constaté que 60% des patients ne présentaient pas de récurrences à long terme après cystectomie et chimiothérapie, ce qui est supérieur à ce que l'on peut obtenir après une cystectomie seule. Dans une étude de Grossman *et al.* en 2003 (dans Dinney 2006), qui compare chimiothérapie néoadjuvante (c'est-à-dire pré-opératoire) et cystectomie, à une cystectomie seule pour les cancers invasifs, la durée médiane de survie était de 46 mois pour la chirurgie seule et de 77 mois pour les autres. Une étude supplémentaire de Herr *et al.* en 2004, précise que les facteurs chirurgicaux tels que les marges d'exérèse, l'extension de la lymphadénectomie pelvienne, et l'expérience du chirurgien ont aussi influé sur le temps de survie des patients de cette étude, indépendamment de la chimiothérapie néo-adjuvante.

Le "Advanced Bladder Cancer Meta-Analysis Collaboration" a analysé des données issues de 10 essais (Stadler *et al.*, 2003, dans Dinney, 2006), impliquant plus de 2000 patients soumis au hasard à une cystectomie avec chimiothérapie néoadjuvante ou à une cystectomie seule : ils concluent à un avantage certain du point de vue du temps de survie, même si le bénéfice serait limité. Le taux de mortalité était réduit de 13%, ce qui équivaut à une augmentation de 5% du taux de survie dans les 5 ans post traitement. Les résultats obtenus avec chimiothérapie pré-opératoire ou post opératoire sont équivalents, mais la chimiothérapie pré-opératoire est préférée car les patients sont à ce stade plus susceptibles de tolérer la thérapie.

➤ Risques :

Malgré ces résultats, associer à la cystectomie une chimiothérapie néoadjuvante n'est pas systématique lors de cancers invasifs, car le bénéfice absolu est limité et non-prévisible, et de plus, la toxicité de ce traitement n'est pas négligeable. Le taux de mortalité de la cystectomie combinée à celui de la chimiothérapie atteint 3 à 10%. Les patients âgés se sont révélés particulièrement fragiles, ce qui impose une sélection précautionneuse des patients devant recevoir une thérapie multimodale (patients chez qui le risque de récurrence après cystectomie justifie la toxicité potentielle de la chimiothérapie dans le cadre d'une cystectomie radicale). (Millikan *et al.*, 2001 dans Dinney, 2006). Les marqueurs validés pour prédire la réponse au traitement ne sont pas encore disponibles, mais seraient utiles pour choisir les patients chez qui un traitement multimodal serait approprié.

Ainsi chez les patients présentant une tumeur confinée à l'organe, il est raisonnable de procéder à une cystectomie initiale, et de baser la décision d'effectuer ou non une chimiothérapie, sur le grade pathologique de la tumeur. Cette approche permet d'épargner aux patients ayant un taux de guérison de 80% avec la chirurgie seule, de la morbidité supplémentaire associée à la chimiothérapie (Dinney 2006). Bouchot et Zerbib (2002) indiquent également qu'il existe un bénéfice de la chimiothérapie dans le cas de tumeurs localement avancées ou métastatiques, mais que dans les autres cas, l'intérêt n'a pas encore été clairement démontré.

→ La chimiothérapie adjuvante à la cystectomie semble présenter un intérêt dans le cas des tumeurs métastasées ou localement avancées, mais présente un risque non négligeable, notamment chez les patients âgés.

1.2.3 Alternatives à la cystectomie radicale

Il existe des alternatives à la cystectomie totale (Bouchot et Zerbib, 2002).

Tout d'abord il est possible de réaliser une RTUV seule, mais cela n'est pratiqué que chez des patients âgés, ASA>III, dont l'espérance de vie est limitée.

On peut associer une radiothérapie à une RTUV complète. Mais cette association n'est envisageable que pour les tumeurs de stade T2a-b, uniques, de taille inférieure à 2 ou 3 centimètres, sans urétéro-hydronephrose, et si le patient est en bon état général.

Enfin, il est possible d'associer radiothérapie et chimiothérapie. Le taux de réponse complète varie de 47 à 90% suivant l'avancement de la maladie. Le taux de récurrence va de 13 à 75% chez les patients ayant répondu. Enfin, le taux de survie à 5 ans, est de 27 à 65% suivant les séries. Cependant ces résultats sont difficiles à apprécier dans leur globalité étant donné la disparité des patients inclus dans les différents protocoles, et la disparité des schémas thérapeutiques employés.

1.2.4 Cas des tumeurs non résécables, et métastasées.

La polychimiothérapie offre une espérance de vie moyenne de 13 à 18 mois pour les patients atteints de cancers fortement métastasés, avec une amélioration notable des symptômes, et une prolongation modeste du temps de survie par rapport aux patients non traités. Seuls 10 à 15% des patients atteignent un temps de survie long, et sans maladie. Ces patients correspondent à ceux présentant des métastases aux nœuds lymphatiques pelviens et traités par polychimiothérapie et cystectomie radicale.

L'association de methotrexate, vinblastine, et doxorubicine (MVD) a fait ses preuves, et les études comparant ce protocole à d'autres associations n'ont pas révélé de meilleur protocole. Les résultats offerts par la chimiothérapie sont donc plutôt en stagnation. Et mis à part la constatation que les cancers avec altération du gène p53 présenteraient une meilleure réponse à la chimiothérapie, les caractéristiques de la tumeur ou de l'hôte conférant une sensibilité ou une résistance à la chimiothérapie ne sont pas connues (Dinney, 2006).

1.3 Les nouvelles approches thérapeutiques

Il m'a paru intéressant de citer les nouveaux traitements actuellement à l'étude. En effet, face aux limites des traitements actuels, de nombreuses études ont été débutées pour découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques ou améliorer les techniques existantes.

➤ Cancer superficiel de la vessie :

Le but actuel est d'améliorer l'efficacité des agents utilisés actuellement et de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques.

Une première approche est de prolonger l'exposition de la muqueuse vésicale à l'agent de chimiothérapie. En effet la plupart des agents sont peu solubles dans les milieux aqueux et/ou totalement éliminés lors de la 1^{ère} miction. Pour cela des **supports métalliques** ont par exemple été créés pour attirer par magnétisme l'agent de chimiothérapie (doxorubicine) à un endroit donné de la muqueuse vésicale (à l'aide d'un aimant externe). Il a aussi été créé des **microsphères bio-adhésives** pour optimiser la libération et l'adhésion à la surface vésicale de certains agents de chimiothérapie peu solubles dans l'eau (paclitaxel, docetaxel) (Shah et McKiernan, 2004).

La deuxième approche est d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales à un agent donné. Cette approche a été utilisée en associant la gemcitabine avec l'**oligodésoxyribonucléotide antisens** du gène de la clusterine (les oligodésoxyribonucléotides antisens sont utilisés pour altérer la fonction de l'ARN ou l'ADN avec lequel ils sont complémentaires). En inhibant l'expression du gène de la clusterine (responsable du phénotype anti-apoptotique de cancers malins variés) il serait possible de rendre les cellules plus sensibles aux effets cytotoxiques de la gemcitabine.

Le **thérapie génique** offre elle aussi de nombreuses possibilités. Notamment l'identification future de gènes associés aux cancers pourra permettre de diminuer l'expression de ceux-ci à l'aide d'oligodésoxyribonucléotides antisens. Ils pourraient aussi être utilisés pour diminuer l'expression de gènes associés à un pronostic plus sombre. (Shah et McKiernan, 2004)

Une autre façon d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux agents thérapeutiques est d'utiliser la **thérapie photodynamique**. Cette méthode consiste en l'utilisation d'agents photosensibilisants, suivie par une exposition à un faisceau lumineux infrarouge. Cette méthode était considérée comme une thérapie intravésicale alternative mais comportant de nombreux effets secondaires vésicaux et cutanés. Mais d'après Shah et McKiernan (2004), French *et al.* ont récemment démontré qu'une thérapie photodynamique à base de mitomycine C, et par l'intermédiaire de l'acide 5-aminolevulinique, diminuait significativement la viabilité des cellules tumorales vésicales *in vitro*.

De nombreux essais sont bien sûr nécessaires pour tester l'innocuité et l'efficacité de ces nouvelles méthodes.

➤ Cancers infiltrants et/ou métastatiques de la vessie :

Pour les cancers infiltrants de la vessie, et compte tenu du fait qu'une chirurgie seule ne permet d'obtenir qu'un taux de survie inférieur à 50%, des thérapies dites multimodales sont mises en place. La principale voie étudiée récemment est l'utilisation d'une chimiothérapie périopératoire systémique.

Mais l'essentiel des recherches visent à identifier et supprimer les mécanismes de la dissémination métastatique. Une des étapes fondamentale dans le développement d'un cancer métastatique étant l'angiogénèse, de multiples recherches sont effectuées pour inhiber ce phénomène. Ainsi l'endostatine, un inhibiteur endogène de l'angiogénèse, a été testé comme agent potentiellement inhibiteur de la croissance tumorale. D'après Shah et Mac Kiernan (2004), Kikuchi *et al.* ont démontré que le transfert du gène de l'endostatine (par l'intermédiaire d'un lentivirus) dans des lignées de cellules tumorales humaines de nature variée, entraînait une diminution de la vascularisation et ainsi une inhibition de la croissance tumorale, lorsqu'ils étaient instillés dans des modèles murins. D'autre part, le TNP-470, un composé dérivé d'*Aspergillus fumigatus*, est connu pour être un puissant inhibiteur de l'angiogénèse et il a été démontré, sur les modèles murins, qu'il inhibait le développement de métastases dans les nœuds lymphatiques. Une autre cible potentielle pour inhiber l'angiogénèse serait le nuclear factor- κ B, un facteur de transcription qui régule l'expression de molécules pro-angiogéniques, en utilisant une technique pour réduire son expression (Shah et McKiernan, 2004).

Enfin, HER2/neu, bien que n'ayant aucun rôle connu dans l'angiogénèse, est un récepteur protéique qui est surexprimé dans les cancers invasifs de la vessie, et qui a été suggéré comme pouvant servir de nouvelle cible thérapeutique. Compte tenu du succès relatif du trastuzumab (Herceptine®), un ACm dirigé contre HER2/neu chez les femmes atteintes de cancer du sein surexprimant HER2/neu, il serait intéressant de tester cette molécule chez les patients atteints de cancers invasifs présentant également une amplification de ce gène (qui existerait seulement dans 5% des cas de cancers invasifs de la vessie) (Shah et McKiernan, 2004).

→ De nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées, et de nouvelles molécules ont été testées sur des modèles murins. Ceci nous conforte dans l'idée qu'un modèle animal adapté est clairement nécessaire avant de pouvoir ensuite appliquer toutes ces nouvelles méthodes à l'homme.

1.4 Tableau récapitulatif du choix du traitement en fonction du stade TNM

Tableau 6 : Choix du traitement en fonction du stade TNM chez l'homme.
(Source : Knapp et al., 2000)

Classif-ication	Description	Traitement (chez l'homme)
Tumeur primitive :		
Tis	Carcinome in situ, restreint à la muqueuse	BCG intravésical, suivi si nécessaire par une cystectomie radicale
Ta	Carcinome papillaire non infiltrant	Résection trans-urétrale + - chimiothérapie intravésicale adjuvante pour les tumeurs à risque faible et intermédiaire OU - BCG thérapie adjuvante pour les tumeurs à risque élevé et intermédiaire
T1	Tumeurs envahissant le chorion muqueux - T1a : chorion superficiel - T1b : chorion profond	Résection trans-urétrale + - chimiothérapie intravésicale adjuvante pour les tumeurs à risque faible et intermédiaire OU - BCG thérapie adjuvante pour les tumeurs à risque élevé et intermédiaire
T2	Tumeurs envahissant le plan musculaire - T2a : muscle superficiel - T2b : muscle profond	Cystectomie radicale
T3	Tumeur envahissant le tissu adipeux périvésical - T3a : envahissement microscopique - T3b : envahissement macroscopique	Cystectomie radicale
T4	Envahissement des organes de voisinage, de la paroi pelvienne ou abdominale - T4a : prostate, utérus, vagin - T4b : paroi abdominale ou pelvienne	Cystectomie radicale
Nœuds lymphatiques locorégionaux		
N1	Métastases dans un seul NL, mesurant 2cm ou moins	Cystectomie radicale + chimiothérapie systémique
N2	Métastases dans un seul NL mesurant 2 à 5 cm ou dans plusieurs NL, dont aucun ne mesure plus de 5 cm.	
N3	Métastase dans un NL mesurant plus de 5 cm	
Métastases à distance		
M1	Métastase dans les organes distants.	Cystectomie radicale + chimiothérapie systémique

2 Chez le chien

Chez le chien, les traitements entrepris sont souvent moins agressifs que chez l'homme, notamment parce que la plupart des propriétaires ne supporteraient pas le coût et les contraintes d'un traitement lourd, surtout lorsque la probabilité de guérison est faible.

2.1 Traitement chirurgical

Ce traitement constitue la base du traitement des tumeurs vésicales. La technique employée varie en fonction de la localisation et de l'extension de la tumeur.

Cependant, le CCT du chien est difficile à retirer chirurgicalement à cause de sa localisation au niveau du trigone, et de l'implication fréquente de l'urètre. En raison de la présence de métastases chez 20% des chiens au moment du diagnostic, la chirurgie est souvent considérée comme un acte palliatif.

Les options chirurgicales incluent une cystectomie partielle, la mise en place d'une sonde de cystotomie permanente, ou d'autres techniques de dérivation urinaire comme la cystectomie totale avec anastomose urétérocolique. Le choix pour le propriétaire s'oriente souvent vers la technique la moins invasive, respectant une certaine qualité de vie de l'animal, avec des conséquences post-chirurgicales acceptables (Henry *et al.*, 2003a).

2.1.1 Cystectomie partielle

Des cystectomies partielles ont été décrites : dans une étude effectuée par Patronek *et al.*, 8 chiens sur 10 ont présenté une rechute locale ou à distance (Knapp *et al.*, 2000). De même Stone *et al.* ont réalisé en 1996 une cystectomie partielle sur 11 chiens atteints de CCT. Les temps de survie s'étendirent de 2 à 48 mois, et le taux de survie à un an était de 54,5% (6/11).

Chez le chien, il est souvent difficile de retirer complètement la tumeur. Dans l'étude de Knapp *et al.* (2000), sur les 102 cas de CCT, seuls 2 chiens ont pu subir une résection complète (affirmation confirmée par l'observation de marges d'exérèse saines à l'examen histopathologique), et pourtant l'un des deux a tout de même présenté une récurrence locale extensive 8 mois après, et l'autre une rechute à distance 4 mois après la chirurgie. Ainsi même lorsque l'exérèse est complète, les récurrences sont fréquentes chez les chiens, comme c'est le cas pour les patients humains subissant une cystectomie partielle. Les autres chiens (100/102) ont dû subir une exérèse partielle, permettant seulement de réduire le volume de la tumeur. Il n'est donc pas surprenant que la durée de survie après la chirurgie soit courte.

D'après une étude effectuée sur 42 chiens ayant subi une réduction chirurgicale de la masse tumorale le temps de survie post-chirurgical ne serait que de 106 jours en moyenne (données issues du « Purdue Comparative Oncology Program », de Lengerich *et al.* (1992), dans Knapp *et al.* 2000). De même, Norris *et al.* (1992) ont rapporté une médiane de survie de 125 jours chez 43 chiens atteints de CCT. Il est important de noter qu'en plus, pendant la période de survie après la chirurgie, de nouvelles lésions sont fréquemment observées à distance du site d'origine.

Les taux de récurrence importants, même après une exérèse complète, pourrait être dû à la présence de tumeurs microscopiques au niveau des marges d'exérèse, ou au développement de nouvelles tumeurs à cause de ce que l'on appelle « l'effet champ » : de nouvelles tumeurs pourraient se développer au sein de la muqueuse saine par le même mécanisme de carcinogenèse qui avait engendré la formation de la tumeur initiale. Un échec de la technique chirurgicale est peu probable pour expliquer des récurrences si fréquentes (Henry *et al.*, 2003a).

2.1.2 Cystectomie complète

La cystectomie complète, qui est une technique de routine pour certains cancers invasifs chez l'homme, est peu développée chez l'animal, de par ses conséquences difficilement tolérables par un propriétaire.

Il existe des techniques de plastie qui ont été étudiées chez le chien, et qui sont mises en œuvre après une cystectomie radicale. Notamment l'anastomose urétérocolique, qui consiste à faire aboucher les uretères dans le colon, et qui a été étudiée sur 10 chiens. Les complications sont fréquentes et comprennent notamment hyperammoniémie, acidose métabolique hyperchlorémique, urémie, et pyélonéphrites (Norris *et al.*, 1992). Des techniques de vaginouréthroplastie de tumeurs localisées et d'iléocystoplastie ont été reportées, mais ces techniques ne sont pas utilisables pour les tumeurs localisées dans la région du trigone vésical (Knapp *et al.*, 2000).

→ *Compte tenu de la fréquence des métastases au moment du diagnostic, la chirurgie est souvent un acte palliatif chez le chien. Il est rarement possible d'effectuer une exérèse complète, et dans tous les cas les récurrences sont fréquentes et le temps de survie faible.*

2.2 **Traitement médical utilisant des drogues anti-cancéreuses**

Compte tenu des forts taux de récurrence et de métastase, le CCT canin est susceptible de nécessiter une chimiothérapie systémique dès le début du traitement ou comme thérapie adjuvante après la chirurgie, si l'on veut obtenir une rémission à long terme voire une guérison. Différentes substances et différentes combinaisons ont été testées.

2.2.1 La chimiothérapie intravésicale

Comme chez l'homme, l'intérêt de la chimiothérapie par voie intravésicale est la réduction des risques de toxicité générale. Elle permet d'accroître la concentration de l'agent dans la vessie. Cependant, la chimiothérapie intravésicale n'est indiquée que lorsque la tumeur est superficielle et n'atteint pas les couches sous muqueuses. C'est donc une technique peu utilisée chez le chien.

Deux agents sont décrits dans la littérature :

- Le thiotépa : Il est efficace dans le cas de tumeur superficielles (pas d'atteinte de la musculature) et permet dans ces cas de prolonger l'espérance de vie. Il est inefficace chez le chien, probablement car la tumeur est souvent trop volumineuse et infiltrante au moment du diagnostic (Helfand *et al.*, 1994).

- Le 5-fluoro-uracile : Cette molécule peut être utilisée en instillation vésicale à 300mg/m² tous les sept jours chez le chien. Cette méthode n'a un intérêt que dans les cas de tumeurs papillaires n'atteignant pas les couches sous-muqueuses (Bojrab *et al.*, 1986).

2.2.2 Traitement médical au piroxicam

Les chercheurs ont commencé à s'intéresser aux anti-inflammatoires non stéroïdiens lorsqu'il a été constaté des rémissions de cancers spontanés chez des chiens, suite à l'administration de piroxicam pour le contrôle de la douleur et sans aucun autre traitement (Mohammed *et al.*, 2002).

➤ Résultats des études :

Henry (2003a) rapporte une étude clinique prospective effectuée par Knapp *et al.* en 1997, dans laquelle le piroxicam a engendré une réponse (partielle ou complète) chez 17% des chiens atteints de CCT (6/34), pour une moyenne de survie de 7 mois.

Dans une autre étude datant de 2002, effectuée par Mohammed *et al.*, 18 chiens atteints de CCT ont reçu un traitement uniquement à base de piroxicam à la dose 0.3 mg/kg/j pendant quatre

semaines. Cette étude confirme l'effet anti-tumoral des inhibiteurs des cyclooxygénases sur le CCT. En effet les résultats obtenus furent les suivants :

- 33% (6/18) des chiens ont présenté une rémission partielle (diminution du volume tumoral $\geq 50\%$),
- 50% d'entre eux ont stabilisé leur maladie (changement du volume tumoral $< 50\%$),
- 17% (3/18) ont présenté une progression de leur maladie (augmentation du volume tumoral $\geq 50\%$ ou apparition de nouvelles lésions).

Ils ont par ailleurs constaté que cet effet antitumoral était étroitement associé à l'induction d'apoptose (Mohammed *et al.*, 2002).

Les inhibiteurs des cyclooxygénases se sont révélés potentialiser les effets de la chimiothérapie dans des tumeurs variées. Un protocole associant piroxicam et une chimiothérapie à base de cisplatine s'est en effet montré plus efficace en terme de rémission partielle :

- 50% des chiens (6/12) ont présenté une rémission partielle,
- 16% (2/12) ont stabilisé leur maladie,
- 32% (4/12) ont présenté une progression de la maladie.

Le temps de survie moyen fut de 329 jours, et 7 chiens sur 14 survécurent plus d'un an. Le problème de ce protocole est la forte toxicité rénale décrite dans les diverses études. Cela impose de restreindre les doses. Cette toxicité est d'ailleurs la raison pour laquelle ce type de protocole n'a pas encore été appliqué à l'homme (Mohammed *et al.*, 2003).

Une autre étude associant piroxicam et mitoxantrone a également été effectuée, par Henry *et al.* (2003c), les résultats seront détaillés dans la partie « 8.2.2.3 : chimiothérapie dans le traitement du CCT canin ». La toxicité de ce protocole semble être moins importante.

➤ Limites, perspectives :

Les AINS semblent avoir un bon potentiel comme agent antitumoral et préventif contre le cancer de la vessie chez l'homme et le chien. Cependant chez de nombreux patients, une administration sur une longue période d'inhibiteur des COX non sélectifs, n'est pas possible, du fait de leur toxicité rénale et gastro-intestinale. Les effets néfastes sont plutôt attribués à l'inhibition de COX-1, d'où l'intérêt des AINS spécifiques de COX-2. L'utilisation d'anti-COX-2 sélectifs récemment mis sur le marché tels que le celecoxib, le rofecoxib et le deracoxib, n'a pas été validé chez le chien en terme d'innocuité et d'efficacité par rapport au CCT (Khan *et al.*, 2000 ; Mohammed *et al.*, 2003).

➤ Mécanisme :

L'inhibition des COX, et les effets anti-inflammatoires et anti-tumoraux sont exercés d'une manière similaire dose dépendante. Cependant, malgré des preuves nettes d'effet pro-apoptotique et anti-prolifératif, les mécanismes par lesquels les AINS apportent un effet antitumoral direct ne sont toujours pas déterminés (Knottenbelt *et al.*, 2006).

Un effet sur le métabolisme de l'acide arachidonique par inhibition des cyclooxygénases a été suggéré. L'inhibition de COX-2 pourrait en fait inhiber le métabolisme de l'acide arachidonique, ce qui modulerait la production d'éicosanoïdes (dont les prostaglandines) et affecterait ainsi la prolifération des cellules tumorales, la néovascularisation au sein de la tumeur, et la capacité du système immunitaire à réagir (Khan *et al.*, 2000).

Selon les études d'immunohistochimie, le pourcentage moyen de cellules exprimant COX-2 est très variable. Cela pourrait expliquer le faible taux de rémission complète ou partielle. Cependant une étude a révélé qu'il n'y avait pas d'association entre l'expression de COX-2 et la réponse au piroxicam (d'après Mutsaers *et al.*, 2000, dans Henry 2003a).

→ Le piroxicam présente un effet antitumoral sur le CCT du chien. Il potentialise l'effet de la chimiothérapie mais il est nécessaire de lui associer des traitements pour en prévenir la toxicité.

2.2.3 La chimiothérapie systémique

Le CCT spontané du chien semble être un bon modèle pour étudier une tumeur solide relativement résistante à la chimiothérapie.

La réponse du CCT du chien à la chimiothérapie s'est révélée similaire à celle obtenue avec un seul agent de chimiothérapie chez l'homme. Les pourcentages de chiens présentant une rémission complète ou partielle (réduction du volume tumoral de plus de 50%) sont de l'ordre de 20%, voire plus bas (Knapp *et al.*, 2000).

Les molécules les plus fréquemment utilisées sont le cyclophosphamide (Endoxan®), la doxorubicine, le mitoxantrone, le cisplatine, le carboplatine.

La doxorubicine, qui est fréquemment employée chez l'homme dans des protocoles de néochemiothérapie, a été peu étudiée chez le chien. Helfand *et al.* ont effectué en 1994 une étude rétrospective chez des chiens atteints de CCT. Un protocole associant doxorubicine et cyclophosphamide a été comparé avec des administrations intravésicales de thiotépa ou une chirurgie seule. Les temps de survie obtenus étaient de 259 jours pour l'association doxorubicine-cyclophosphamide, contre 86 jours avec la chirurgie seule et 57 jours avec le thiotépa en intravésical.

En ce qui concerne le cisplatine, malgré son utilisation pour traiter le CCT de l'homme et son apparente cytotoxicité envers le CCT canin *in vitro*, il se révèle décevant dans le traitement du CCT canin. D'après Henry (2003a), le taux de réponse est de moins de 25%, avec une médiane de survie de 6 mois ou moins selon les études. Dans une étude de Moore *et al.* effectuée sur 15 chiens traités avec du cisplatine, à la dose de 50 mg/m², le pourcentage des chiens ayant présenté une rémission complète ou partielle n'était que de 20% (Knapp *et al.*, 2000).

Une association cisplatine-piroxicam semble bénéfique puisqu'il a été démontré que le taux de réponse atteignait 71%. Cependant lors de l'étude, une toxicité rénale est apparue dans 87% des cas, ce qui contre-indique l'emploi de ce protocole si le dosage n'est pas adapté pour en réduire la toxicité tout en maintenant une bonne efficacité (Henry *et al.*, 2003a).

Cet agent de chimiothérapie n'est aujourd'hui plus disponible sur le marché.

Le carboplatine est un sel de platine beaucoup plus soluble que le cisplatine, et n'ayant pas de ce fait la même toxicité rénale. C'est donc une alternative intéressante bien que très coûteuse. Une étude prospective effectuée par Chun *et al.* en 1997 chez 14 chiens atteints de CCT et ayant reçu du carboplatine à la dose de 300 mg/m² toutes les trois semaines n'a obtenu aucune rémission. Un protocole associant carboplatine et piroxicam a ensuite été évaluée par Knapp *et al.* en 1997 (d'après Henry, 2003a) et a permis d'obtenir cinq rémissions sur un total de treize chiens, soit un taux de rémission de 38% ce qui est supérieur aux résultats obtenus avec le carboplatine seul. Cependant le temps moyen de survie des chiens traités avec ce protocole (93 jours) n'est pas meilleur que celui obtenu avec le carboplatine seul (132 jours) ou avec le piroxicam seul (180 jours). Mais la plupart des chiens n'ayant pas répondu au carboplatine dans la 1^{ère} étude (soit 10 sur 14) ont reçu un autre traitement en plus (piroxicam, mitoxantrone ou actinomycine D), ce qui fait qu'il est difficile de comparer les résultats avec ceux des autres études, au-delà des taux de rémission initiaux.

Le mitoxantrone est connu pour avoir une activité antitumorale contre les cancers de la vessie de l'homme et du chien (Henry *et al.*, 2003a). N'étant pas néphrotoxique, son utilisation en association avec des AINS serait ainsi moins susceptible d'entraîner une toxicité rénale. Une étude

prospective évaluant la tolérance et les effets d'une association mitoxantrone – piroxicam a été effectuée par Henry *et al.* (2003c). Cinquante cinq chiens ont subi ce protocole, comprenant quatre traitements au mitoxantrone (5mg/m² en intraveineux, tous les 21 jours) avec une administration quotidienne de piroxicam pendant la durée du traitement (à la dose de 0,3 mg/kg/j). Ils ont obtenu une réponse complète (2%), 16 réponses partielles (29%), 22 cas chez lesquels la maladie s'est stabilisée (40%), et neuf cas chez lesquels la maladie a continué à progresser (16%). Une amélioration clinique a été notée chez 75% des chiens. La plupart des complications traitées étaient liées à une toxicité gastro-intestinale et une urémie, qui apparurent respectivement chez 18% et 10% des chiens traités. Le temps de survie moyen était de 350 jours. Ce protocole étant mieux toléré et induisant des rémissions plus fréquentes qu'avec les autres protocoles, il est conseillé par l'auteur comme thérapie initiale du CCT canin (Henry *et al.*, 2003c).

Des protocoles agressifs utilisant plusieurs molécules n'ont pas encore été testés chez le chien, notamment car les propriétaires refusent de voir leur chien subir les effets toxiques associés à ce type de protocole, surtout si les chances de guérison sont faibles.

2.3 La radiothérapie

Elle est très peu utilisée dans le traitement du CCT du chien.

➤ Résultats :

Walker et Breider (d'après Knapp *et al.*, 2000) ont rapporté en 1987 l'association d'une résection chirurgicale (la plus complète possible) associée à une radiothérapie uniquement peropératoire chez treize chiens atteints de tumeur vésicale, par une méthode de téléthérapie au ¹³⁷Cs. Ils ont obtenus une durée de survie moyenne de 15 mois pour les onze chiens présentant un carcinome transitionnel. Les taux de survie à un an, 18 mois et deux ans furent de 54%, 27% et 9% respectivement. Une récurrence fut notée dans six cas (soit 46% des cas).

D'après Henry (2003a), un autre article de Withrow *et al.* rapporte le cas de 16 chiens dont sept cas de CCT, traités par radiation per-opératoire en 1989 (la dose totale reçue étant comprise entre 1000 cGy et 3160 cGy, et avec un accélérateur linéaire avec 6 mV d'électrons). Cinq des sept chiens atteints de CCT ont subi en plus des séances de radiothérapie post opératoires. Les temps de survie s'étendirent de 1 à 13 mois. Ces résultats semblent moins bons, mais la chirurgie était moins complète que dans l'étude de Walker et Breider (Henry *et al.*, 2003a).

Enfin dans une étude datant de 1992, effectuée par Norris *et al.*, neuf chiens atteints de CCT furent traités par radiothérapie et chirurgie. Les doses totales de radiation furent de 0 cGy à 3000 cGy en per-opératoire, avec une irradiation supplémentaire de 0 à 4800 cGy en post-opératoire. Les temps de survie furent compris entre 30 et 360 jours, avec une moyenne à 105 jours.

De même, dans une thèse vétérinaire expérimentale effectuée en 1993 (Brutus, 1993), le temps moyen de survie après exérèse chirurgicale et radiothérapie peropératoire était de 9 mois, et il semblait que la radiothérapie peropératoire présentait surtout un intérêt pour les tumeurs détectées précocément.

➤ Intérêts :

Enfin, bien que le coût d'une radiothérapie la rende souvent rédhibitoire pour les propriétaires, les avantages qu'elle peut procurer sont notables (Brutus, 1993) :

- en pré opératoire, la radiothérapie permettrait une disparition de l'hématurie, une diminution de la taille de la tumeur, des bords plus facilement définis lors de la cystotomie, cela diminuerait la

quantité de tissu retiré, préviendrait l'apparition de greffes tumorales pariétales après cystotomie, et éviterait un ensemencement per-opératoire (diminution du risque de métastases futures).

- en per-opératoire : la zone à irradier est directement accessible, et cela permettrait de diminuer la dissémination des cellules tumorales provoquée par la chirurgie.

- en post-opératoire : cela a un intérêt surtout lorsque l'exérèse est incomplète.

➤ Effets indésirables :

Les effets indésirables de la radiothérapie incluent pollakiurie, incontinence (46%), cystite (38%), strangurie (15%), et hydronéphrose, dans l'étude de Walker et Breider. Quatre chiens ont dû être euthanasiés à cause des effets secondaires de la thérapie. L'incontinence et la fibrose vésicale sont les effets secondaires rapportés chez six chiens (sur neuf) dans l'étude de Norris *et al.* (1992).

Withrow *et al.* ont remarqué que lorsque les uretères recevaient des radiations ils avaient tendance à se sténoser et à être responsable secondairement des hydro-uretères et hydronéphroses. Une fibrose de la vessie, avec perte de la compli-ance vésicale pendant 1 ou 2 mois, et une incontinence urinaire sont donc des effets néfastes redoutés.

➤ Protocoles mixtes :

Enfin, d'après Henry (2003a) un protocole associant radiothérapie et chimiothérapie à base de cisplatine a été évalué sur 2 chiens (un CCT et un carcinome à cellules squameuses) par Shapiro *et al.* en 1988. Les 2 chiens furent traités par une méthode de téléthérapie avec du Cobalt-60, fractionné en utilisant 400 cGy par fraction, avec des doses totales de 44000 cGy et 4800 cGy. Le cisplatine fut administré à la dose de 50 mg/ m², divisé en trois doses, administrées 6 à 8h avant chaque séance d'irradiation, en intra-artériel pour les 3 premières séances, puis le schéma d'administration fut identique pour les trois autres séances qui suivirent, mis à part la voie d'administration qui cette fois était la voie intra-veineuse. Les deux chiens présentèrent une amélioration clinique et une réduction de la taille de la tumeur. Les temps de survie furent de 6 et 7 mois.

Plus récemment un protocole incluant six séances de radiothérapie hebdomadaires, du piroxicam (0,3mg/kg/j) et du mitoxantrone (5mg/ m² en IV tous les 21 jours) a été étudié sur 10 chiens atteints de CCT par Poirier *et al.* en 1999 (D'après Henry *et al.*, 2003a). Aucune rémission partielle ou complète ne fut notée mais sept chiens présentèrent une amélioration clinique pendant 47 à 320 jours (médiane de 90 jours). Les effets indésirables précédemment rapportés suite aux irradiations ne furent pas constatés dans cette étude. Le protocole fut ainsi très bien toléré (les effets secondaires étaient modérés et comprenaient un cas de dermatite, un cas d'hyperpigmentation et quatre cas incontinence urinaire modérée).

→ *On peut conclure de l'ensemble de ces études qu'il n'a pas été mis en évidence un bénéfice net de la radiothérapie (par faisceau externe) en supplément d'une irradiation peropératoire seule. Il semblerait aussi que les doses d'irradiation ne devraient pas dépasser 3000 cGy pour minimiser les risques de fibrose urétrale.*

IX. BILAN

Le *tableau 7* page suivante fait le bilan des points communs et différences entre le CCT canin et le CCT invasif humain.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des points communs et différences entre le CCT invasif humain et le CCT canin (Source : Knapp et al., 2000)

	CCT CANIN	CCT HUMAIN
SIMILITUDES		
% de tous les cancers	1,5-2 %	2%
Age moyen lors du diagnostic	11 ans (équivalent à 60 ans chez l'homme)	64 ans
Facteurs de risques		
Population à risque	Races (ex scottish terrier)	Ethnies (ex africains américains)
Environnement	Risque accru dans les zones urbaines	Risque accru dans les zones urbaines
Benzene	Risque accru en cas d'exposition à des insecticides contenant du benzène ou autres composants inertes	Risque accru en cas d'exposition au benzènes et aux hydrocarbures polycycliques aromatiques
Cyclophosphamide	Un petit nombre de cas de CCT rapportés chez des chiens ayant reçu du cyclophosphamide pour le traitement d'une autre tumeur.	Risque accru avec l'exposition
Histopathologie	CCT invasif de grade intermédiaire à haut (>90% grades 2 et 3)	CCT invasif de grade intermédiaire à haut (70% de grades 2 et 3)
Autres caractéristiques cellulaires		
Ploïdie ADN	79% d'aneuploïdie	L'aneuploïdie est corrélée avec le stade et le grade
Glycoprotéine associée aux tumeurs	Immunoréactivité aux anticorps anti TAG-72	Immunoréactivité aux anticorps anti TAG-72
Concentration urinaire en bFGF	Augmentée lors de CCT	Augmentée lors de CCT
Expression de p53 (mutée)	P53 détectée dans un petit nombre d'échantillons et de lignées cellulaires de CCT	L'expression de p53 est corrélée avec le grade et le stade
Expression des cyclooxygénases	COX-2 surexprimé, augmentation des concentrations en PGE2 dans le tissu tumoral et le plasma	COX-2 surexprimé dans le tissu tumoral d'après une étude préliminaire.
Signes cliniques	Hématurie, dysurie, infection du tractus urinaire sont les plus fréquents, la douleur osseuse est rare.	Hématurie, infection du tractus urinaire sont les plus fréquents, la douleur osseuse est un symptôme moins fréquent.
Métastases au diagnostic	20% des chiens	5 à 20% des patients
Sites des métastases	Nœuds lymphatiques loco-régionaux et poumons, surtout.	Nœuds lymphatiques loco-régionaux et poumons, surtout.
Réponse à la monochimiothérapie		
Cisplatine	12-20%	17-34%
Carboplatine	<10%	15%

Facteurs pronostiques Stade TNM Envahissement de la prostate	Stade TNM avancé associé à une diminution du temps de survie Associé à la présence de métastases à distance au moment du diagnostic et à une diminution du temps de survie	Stade TNM avancé associé à une diminution du temps de survie Associé à un temps de survie plus court, surtout lorsque le stroma de la glande est impliqué
DIFFERENCES		
Ratio mâle/femelle	0,5/1	2,8/1
Localisation de la tumeur au sein de la vessie	Majoritairement au niveau du trigone	Paroi latérale (37%), paroi postérieure (18%), trigone et col (23%), autres sites (22%)

Le carcinome à cellules transitionnelles spontané du chien présente de nombreuses similarités avec le cancer invasif de la vessie de l'homme, du point de vue notamment de ses caractéristiques histologiques, son comportement biologique, et sa réponse à la monochimiothérapie. Des anomalies moléculaires communes ont aussi été mises en évidence.

Toutefois, à la différence de l'homme, le dépistage tumoral est tardif avec en corollaire, la détection de tumeurs plus invasives de très mauvais pronostic.

Ainsi on peut considérer que le CCT du chien constitue un bon modèle animal du cancer invasif de la vessie humaine.

3^{EME} PARTIE : L'IMMUNOTHÉRAPIE DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS VESICALES

L'immunothérapie représente une technique nouvelle et prometteuse dans le traitement des cancers de la vessie, et elle offre, en outre, un grand panel de stratégies thérapeutiques différentes. L'intérêt de développer de nouveaux traitements réside essentiellement dans le fait que les traitements actuels présentent de nombreuses limites, comme il l'a été démontré précédemment :

- la chirurgie n'est pas toujours complète, ou parfois elle est impossible
- la chimiothérapie et la radiothérapie ont l'inconvénient d'exercer leurs effets de la même façon sur les cellules saines qui ont également besoin de se multiplier pour le renouvellement tissulaire, entraînant alors de considérables effets indésirables systémiques.

D'autre part ces techniques ont seulement une efficacité limitée sur les cancers très avancés.

Et les récurrences étant fréquentes, il existe un réel besoin d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces.

L'immunothérapie est actuellement utilisée dans le traitement des cancers superficiels de la vessie (stade Tis) ou comme traitement adjuvant dans les stades Ta et T1 pour les tumeurs à risque de récurrence élevé ou moyen.

I. PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DES CANCERS DE LA VESSIE

Les cancers superficiels de la vessie répondent bien à l'immunothérapie par BCG. C'est une des raisons pour lesquelles l'immunothérapie a été suggérée comme une stratégie potentiellement intéressante de traitement des cancers de la vessie. Par ailleurs il a été constaté que les cancers de la vessie présentaient certaines particularités immunologiques qui ont permis de mettre en exergue l'intérêt de l'immunothérapie dans le traitement de ce type de cancer.

En effet, il a été constaté qu'un profil de cytokines de type Th2 dominait l'environnement tumoral dans les cancers de la vessie. C'est en fait ceci qui les rend susceptibles de répondre à l'immunothérapie, car le but du traitement va alors être d'inverser ce profil en un profil de type Th1.

Par ailleurs les lymphocytes issus de patients atteints de carcinomes superficiels de la vessie présentaient une moindre réactivité aux mitogènes, et qu'en plus, l'activité NK était diminuée. Les patients atteints de tumeurs de haut grade ou de tumeurs invasives présentaient une réactivité lymphocytaire encore plus faible. Ces données indiquent que les patients atteints de cancers de la vessie présente une immunosuppression vis-à-vis des antigènes tumoraux (Totterman *et al.*, 2005).

Les autres voies d'échappement tumoral constatées dans les cancers de la vessie incluent une plus grande expression des inhibiteurs de l'apoptose (cFLIP et PI-9) dans les biopsies de cancers de la vessie (d'après Loskog *et al.*, donnée non publiée, citée dans Totterman *et al.*, 2005), et une sous-régulation du récepteur Fas dans les lignées de cellules vésicales (Perabo *et al.*, 2001). Ces découvertes impliquent que les cellules des cancers de la vessie pourraient avoir une plus grande résistance à l'apoptose, et qu'une attaque immunitaire puissante serait nécessaire pour surmonter ces barrières.

Enfin, la vessie est un bon candidat aux nouvelles thérapies telles que l'immunothérapie, car c'est un organe « accessible ».

II. IMMUNOTHERAPIE PASSIVE DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS SUPERFICIELS DE VESSIE

Dans le cadre des traitements des tumeurs superficielles de vessie, les études cliniques en immunothérapie passive sont limitées.

1 Anticorps monoclonaux

Pour un grand nombre de cancers, les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes spécifiques de tumeur ont fait l'objet de nombreuses études pré-cliniques et cliniques (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Un bon exemple est l'utilisation du Trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'Epidermal growth factor, appelé HER2, dans le traitement des cancers du sein métastatiques, exprimant HER2. Une étude portant sur l'efficacité d'un traitement associant cet anticorps monoclonal et une chimiothérapie chez des patients atteints de cancers du tractus urinaire métastasés (incluant des cancers de vessie) est en cours (phase II des essais cliniques) à l'« University of Michigan Comprehensive Cancer Center » située aux Etats-Unis (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Des études sur l'administration intravésicale de l'anticorps monoclonal anti-mucine MUC1 (ACm C595) tracé à l'aide d'un radio-isotope ont montré un captage efficace de l'agent par les cellules tumorales de patients présentant un cancer superficiel de la vessie. En effet, MUC1 est exprimé sur l'urothélium normal, au niveau de la membrane apicale, et sur les carcinomes transitionnels. L'expression cytoplasmique est d'autant plus importante que le stade et le grade sont élevés. La conclusion de cette étude est qu'une rétention plus importante de l'agent est nécessaire pour un développement futur d'une thérapie efficace. Aucune donnée n'est mentionnée sur l'éventuelle efficacité de ce traitement, mais par contre, aucun patient n'a développé de réponse « anti-AC murin » détectable (Schenk-Braat et Bangma, 2005 ; Broghammer et Ratliff, 2002).

Pour le traitement des cancers de la vessie, aucune étude clinique de phase I ou II utilisant des anticorps monoclonaux n'a été publiée. (Schenk-Braat et Bangma, 2005) Les anticorps monoclonaux sont pour l'instant utilisés comme outil diagnostique ou comme thérapie adjuvante, mais pour l'heure, aucune étude n'a démontré l'efficacité des anticorps monoclonaux utilisés seuls (Broghammer et Ratliff, 2002).

2 Cellules immunitaires

2.1 Non spécifiques

Une étude clinique a démontré l'innocuité et l'efficacité de l'instillation intravésicale de MAK : Macrophages Activated Killer. Les cellules MAK sont fabriquées par activation *in vitro* de cellules mononucléées autologues à l'aide d'interféron gamma (INF- γ). Après transfert au patient, ces cellules sont capables de tuer des cellules d'une manière non spécifique. Le nombre de récidives après résection transurétrale pendant l'année ayant suivi le traitement fut réduit en comparaison à l'année précédente (sans traitement) (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

2.2 Spécifiques : l'immunothérapie adoptive

Comme nous l'avons vu précédemment, cela consiste à isoler des cellules T du patient et de les stimuler *in vitro* par les antigènes associés à la tumeur. Les cellules T spécifiques de la tumeur ainsi activées peuvent être retransférées chez le patient pour y réaliser une destruction spécifique des

cellules tumorales. Il n'y aurait pas encore eu d'étude clinique publiée à ce jour (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Un étude préclinique portant sur l'efficacité de cellules T spécifiques d'une surexpression de p53, dans un modèle de cancer de vessie murin, a montré la faisabilité de l'immunothérapie adoptive dans ce type de cancer. La croissance des tumeurs hétérotopiques a été ralentie de façon significative, et leur volume a diminué. Mais la croissance a juste été légèrement retardée dans le modèle orthotopique (Schenk-Braat et Bangma, 2005, Broghammer et Ratliff, 2002).

L'efficacité de l'immunothérapie adoptive a été démontrée dans le traitement du mélanome et cette technique pourrait se montrer également efficace dans le traitement des cancers de la vessie. Un obstacle majeur pour le développement clinique de l'immunothérapie adoptive est le besoin d'antigènes tumoraux appropriés et spécifiques des cancers de vessie, ainsi que la nécessité d'effectuer au préalable un certain nombre de recherches pré-cliniques (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

III. IMMUNOTHERAPIE ACTIVE DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS SUPERFICIELS DE VESSIE

1 Agents stimulants d'origine non humaine

Divers agents ont été évalués au cours d'études précliniques et cliniques dans le but d'être utilisés comme thérapies adjuvantes dans le traitement des cancers superficiels de la vessie.

1.1 Etude de la BCG thérapie

Parmi les différents agents étudiés, le BCG est considéré comme le plus efficace et comme le traitement de choix en tant que thérapie adjuvante des cancers superficiels de la vessie à haut risque (Böhle et Brandau, 2003 ; Schenk-Braat et Bangma, 2005 ; Broghammer et Ratliff, 2002).

Le vaccin BCG vivant atténué était initialement utilisé pour la prévention de la maladie associée à *Mycobacterium tuberculosis*, et était à l'origine un dérivé du tubercule virulent de *Mycobacterium bovis* (étroitement apparenté) mis au point par Calmette et Guérin. Le BCG actuel diffère beaucoup de *M. bovis*. En effet, il a été atténué de façon à éliminer la plupart des gènes de virulence, afin d'obtenir le vaccin actuel contre la tuberculose.

Il est un agent immunomodulateur bien connu dans le traitement des cancers de la vessie.

1.1.1 Principe

Des recherches ont montré que ce type de traitement induisait une réponse inflammatoire locale massive (Böhle et Bandau, 2003 ; Schenk-Braat et Bangma, 2005). Le mode d'action exact reste inconnu à l'heure actuelle. Un système immunitaire compétent semble nécessaire car les souris ayant subi une ablation du thymus n'ont pas développé de réponse sous traitement au BCG. Il a été également démontré au travers d'études cliniques et précliniques que le système immunitaire inné et la réponse cellulaire du système immunitaire acquis étaient tous deux impliqués (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

➤ Mise en évidence d'une réponse immunitaire suite au traitement au BCG :

Une infiltration cellulaire constituée principalement de cellules T et de macrophages au sein de la paroi vésicale a été mise en évidence suite au traitement intravésical au BCG. Cette injection

entraînait apr ailleurs la production de nombreuses cytokines dans les tissus vésicaux, une sécrétion urinaire de cytokines, et une pyurie (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

La plupart des cytokines détectées dans les urines de patients traités au BCG sont connues pour être impliquées dans l'initiation ou la maintenance des processus de l'inflammation. D'autre part, le profil de cytokines suggère que le BCG induit principalement une réponse de type Th1. Un certain nombre de chimiokines sont également détectées dans les urines des patients traités ; ces chimiokines contribueraient à l'afflux important de sous-populations leucocytaires dans la vessie (Böhle et Bandau, 2003).

En plus de cette réponse humorale, les patients traités présentent un infiltrat cellulaire granulomateux dans la paroi vésicale. Le BCG semble ainsi induire une réponse immunitaire de longue durée. Avant la thérapie, seul un petit nombre de leucocytes peuvent être détectés dans le stroma sous-urothélial des zones non tumorales. Après plusieurs instillations de BCG, une accumulation précoce de granulocytes peut être observée, suivis par un afflux de macrophages et de lymphocytes. Les analyses immunohistochimiques révèlent que la population dominante dans les granulomes des patients traités est constituée par les cellules CD4+. L'afflux des cellules immunitaires dans la paroi vésicale coïncide avec l'augmentation de l'expression de marqueurs d'activation (HLA-DR, CD25 et molécule d'adhésion cellulaire-1) sur les cellules infiltrées et sur l'urothélium, qui de plus, expriment fortement les molécules du CMH de classe II à la fin de la thérapie. Ces changements persistent pendant plus d'un an après le début de la thérapie, mais ils commencent à diminuer au bout de 3 à 6 mois (Böhle et Bandau, 2003). Les infiltrats cellulaires peuvent ainsi être considérés comme des centres persistants d'immuno-activation à long terme (Böhle et Bandau, 2003).

Le BCG induit donc une stimulation du système immunitaire local.

➤ Mode d'action :

Des études sur des modèles animaux ont permis de mieux comprendre le mode d'action du BCG. Lors d'un traitement avec le BCG, plusieurs centaines de bactéries sont instillées dans la vessie, la plupart d'entre elles sont éliminées au cours de la 1^{ère} miction post-traitement, mais un certain nombre d'entre elles vont adhérer à la paroi vésicale (Böhle et Brandau, 2003).

L'hypothèse actuelle est que le BCG se lie à la paroi vésicale par l'intermédiaire de la fibronectine, protéine composante de la matrice extracellulaire de la mycobactérie. D'après Schenk-Braat et Bangma (2003), le BCG serait ensuite internalisé par endocytose dans les cellules urothéliales, ce qui entraînerait le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules Th1, probablement par l'intermédiaire des chimiokines sécrétées. L'activation des Cellules Th1 pourrait également avoir été induite par une présentation par les cellules dendritiques des antigènes tumoraux libérés par les cellules endommagées suite à l'infection par le BCG, et qui auraient ainsi pu subir une endocytose par les cellules présentatrices d'antigène.

Les cellules Th1 induisent ensuite la prolifération et l'activation des cellules T cytotoxiques et des LAK par la sécrétion d'une cascade de cytokines pro-inflammatoires, notamment d'IL-2 et d'IFN- γ . De plus le TNF- α libéré par les macrophages activés a une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales et inhibe la prolifération tumorale ainsi que l'angiogénèse.

D'après Böhle et Brandau (2003), Prior et al (1995) ont rapporté que le BCG, en plus d'induire la sécrétion de cytokines et d'activer les cellules immunitaires, exercerait un effet antiprolifératif sur certaines lignées de cellules tumorales : la haute densité de Mycobacterium altérerait la prolifération et la viabilité des cellules tumorales lorsqu'elle serait liée à ces cellules.

➤ Cellules et cytokines impliquées dans la réponse au traitement

Des études réalisées sur des lignées de souris ont permis de mettre en évidence l'implication des cellules immunitaires dans la réponse au traitement. L'activité antitumorale du BCG semble en effet dépendre de l'interaction des différentes sous catégories de lymphocytes : en effet la déplétion en

CD8+ ou CD4+ abolit l'effet du BCG. Il a aussi été mis en évidence que l'activité NK était primordiale pour l'effet thérapeutique du BCG. Il reste ensuite à savoir si ces différentes catégories cellulaires exercent un effet antitumoral par cytotoxicité directe ou par la libération de cytokines (Böhle et Brandau, 2003).

La sécrétion de cytokines observée dans les urines est très variable d'un individu à l'autre, et ceci pourrait être corrélé à la manière dont les patients répondent au traitement au BCG (Böhle et Bandau, 2003). D'après Broghammer et Ratliff (2002), et Böhle et Brandau (2003), il a été démontré que les patients répondant au BCG avaient un taux plus élevé d'IL-1, d'IL-2, de IFN- γ et de TNF- α et un taux plus faible d'IL-6 et d'IL-4 dans les urines, comparés aux autres, or ce profil de cytokines indique qu'une réponse à médiation cellulaire de type Th1 est induite. L'équilibre Th1/Th2 jouerait donc un rôle important dans l'efficacité du traitement au BCG (Böhle et Brandau, 2003). Il semblerait par ailleurs que la présence d'IL-2 serait corrélée à la récurrence : les patients ayant des taux plus élevés développent des récurrences plus tardives, quel que soit le grade et le stade de la tumeur (Broghammer et Ratliff, 2002 ; Böhle et Brandau, 2003).

En plus de l'activation des leucocytes, le BCG pourrait moduler le phénotype des cellules tumorales par l'induction de molécules d'adhésions telles que les molécules du CMH et ICAM-1. Ainsi l'interaction avec les cellules effectrices s'en trouve facilitée, faisant de la tumeur une cible plus facile à éliminer. Eventuellement, les cellules tumorales pourraient être détruites directement par un grand nombre de cellules effectrices incluant les cellules T cytotoxiques, les cellules BAK (BCG-activated killer : sous population de cellules NK activées), et les cellules LAK, et indirectement par les effets anti-prolifératifs et anti-angiogéniques des cytokines libérées (Schenk-Braat et Bangma, 2005). Certaines études indiquent même que les cellules T CD4+ serviraient de cellules « accessoires », et que les cellules effectrices seraient les BAK, qui présentent une cytotoxicité cellulaire *via* l'action de perforines (dans Böhle et Brandau, 2003).

1.1.2 Résultats / critères d'utilisation

Le BCG est utilisé comme thérapie adjuvante chez les patients à hauts risques de récurrence et de progression tumorale. (Broghammer et Ratliff, 2002).

Le traitement à base de BCG est actuellement considéré comme la technique d'immunothérapie la plus efficace du point de vue clinique. Il a été démontré que le BCG prévenait les récurrences mais aussi la progression (Böhle et Bandau, 2003), traitait les tumeurs résiduelles, et qu'il prolongeait l'espérance de vie du patient. Le BCG est donc actuellement le traitement de choix face aux carcinomes transitionnels superficiels agressifs (Broghammer et Ratliff, 2002).

Le taux de réponse complète est de 70-75% et la rémission persiste sur une période de 5 ans chez 70% des patients (Totterman *et al.*, 2005).

1.1.3 Inconvénients / limites

Il existe tout de même des contre-indications à ce traitement : la prise d'un traitement immunosuppresseur, une tuberculose active, des antécédents de réactions systémiques à la tuberculose, une fièvre inexpliquée et des antécédents de cystectomie totale.

L'utilisation d'organismes vivants est source d'inquiétude. En effet, les effets indésirables (décrits dans le paragraphe suivant), le risque d'accidents, ainsi que la difficulté à prévoir la réponse des patients, représentent des inconvénients majeurs pour la BCG-thérapie. Si la tolérance semble diminuer avec l'emploi de schémas intensifs d'instillations, des réactions sévères peuvent cependant intervenir dès la première instillation. Les mesures préventives (INH, antibactériens), se sont révélées, jusqu'à ce jour, inefficaces (Saint *et al.*, 2002).

➤ Toxicité/ effets indésirables :

Une étude réalisée en 2002 par Saint *et al.*, a classifié les effets indésirables liés à l'instillation de BCG, selon leur type, leur sévérité et leur durée, afin de pouvoir mieux les mesurer.

L'irritation locale suite à l'instillation est un des effets indésirables les plus fréquents. Les symptômes observés sont similaires à ceux développés lors de cystites infectieuses bactériennes (pollakiurie, dysurie, impériosités mictionnelles, hématurie, brûlures mictionnelles), et ils apparaissent dans les 48 heures suivant l'instillation. Lorsque le BCG est utilisé comme traitement d'entretien, tous les patients sont touchés par ces symptômes. Cependant ces effets indésirables régressent spontanément, le plus souvent en deux jours, mais cela peut parfois aller jusqu'à plusieurs semaines voire plusieurs mois. La persistance de ces phénomènes locorégionaux pendant plus de sept jours, est responsable de la suspension voire de l'arrêt du traitement lors de l'utilisation de protocoles d'entretien

Associés à ces effets d'irritation, on rencontre aussi fréquemment une atteinte régionale notamment des prostatites (dans environ 80% des cas mais la plupart sont asymptomatiques et passent inaperçus).

Il existe également des effets indésirables systémiques, qui semblent liés à 2 mécanismes :

- un mécanisme infectieux où le BCG, produit biologique vivant, peut disséminer dans pratiquement tous les organes par voie hémotogène,
- un mécanisme immunoallergique.

Lors du schéma classique de traitement par six instillations, la fièvre est le symptôme des effets indésirables systémiques le plus souvent rencontré : une fièvre de bas grade dans 11 à 60 % des cas selon les études, ou de grade modéré dans 2 à 9 % des cas.

Cependant des affections plus graves peuvent survenir, notamment une septicémie, qui peut s'accompagner d'une détresse respiratoire aiguë, un collapsus cardiovasculaire, une coagulation intravasculaire disséminée ou encore une hépatite. Des cas de décès ont même été occasionnellement rapportés dans la littérature. La preuve de la responsabilité du BCG dans ces effets indésirables graves est rarement faite, un rapport de la pharmacovigilance des laboratoires Aventis Pasteur retrouve le BCG dans 30% des cas de complications graves (Saint *et al.*, 2002).

Les effets indésirables systémiques immunoallergiques sont, eux aussi, très rares et essentiellement représentés par le syndrome de Fiessinger Leroy Reiter ou les polyarthrites apparentées (Saint *et al.*, 2002).

Une étude récente, publiée par le service de pharmacovigilance des laboratoires Aventis Pasteur, a rapporté un taux de 0,35 pour 100 patients, d'événements indésirables graves, mais l'incidence de ces effets serait, d'après Saint *et al.*, sous-estimée car sous-déclarée.

Il existe des facteurs favorisant les effets indésirables graves, notamment :

- les instillations traumatiques,
- un délai inférieur à 15 jours entre la résection et la 1^{ère} instillation,
- la mise en place d'un protocole d'entretien avec un schéma d'instillation accéléré (non adaptation de la dose en fonction de la tolérance individuelle),
- une infection urinaire concomitante.

Il est recommandé de différer l'instillation suivante de deux semaines en cas d'intolérances ou de présence d'un facteur favorisant car cela permet de diminuer le risque d'effet indésirable grave, sans altérer l'efficacité du traitement (Saint *et al.*, 2002).

Enfin il existe des traitements pour limiter les effets indésirables, notamment des antibiotiques (antibiotiques habituellement actifs sur le bacille de la tuberculose, sauf pour le pyrazinamide et la cycloserine auxquels le BCG est naturellement résistant), et des traitements symptomatiques associant spasmolytiques, antipyrétiques et antalgiques, anti-inflammatoires ou

antihistaminiques, voire des corticoïdes lors de réaction inflammatoire systémique grave. Les symptômes ne sont traités que lorsqu'ils dépassent 48 heures pour les symptômes pseudo-grippaux, et sept jours pour les phénomènes de cystite, ou lorsqu'ils deviennent réellement invalidants (ce qui est souvent le cas avec le protocole d'entretien). L'absence d'amélioration après une semaine de traitement doit conduire à l'administration d'une association d'antituberculeux jusqu'à la disparition des symptômes et à la suspension des instillations par BCG (Saint *et al.*, 2002).

➤ Patients réfractaires :

Les résultats du traitement au BCG sont variables et il existe des tumeurs réfractaires à ce traitement. Les seuls facteurs prédictifs de la réponse au traitement qui sont significatifs sont la présence d'effets secondaires avec une réaction systémique fébrile, une leucocyturie importante, et la production de cytokines au cours des instillations (en particulier IL-2, IL-18, et IL 8) (Chopin et Gattnego, 2002).

Le fait que le BCG soit inefficace sur les cancers avancés pourrait refléter l'incapacité du BCG à activer les CTLs. Le BCG activerait essentiellement l'immunité innée. En effet, pour développer une mémoire immunitaire et une immunité systémique, le système de l'immunité acquise avec des CTLs spécifiques de la tumeur, doit être impliqué (Totterman *et al.*, 2005).

➤ Solutions proposées :

Lorsque les tumeurs sont réfractaires au BCG on a recours à la chimiothérapie endovésicale. Un nouvel agent de chimiothérapie, la Gemcitabine, semble donner d'assez bons résultats chez les patients réfractaires au BCG (Shah et McKiernan, 2004).

Des stratégies alternatives utilisant des fractions non viables de *Mycobacterium* ont été étudiées, mais elles n'ont pas montré une efficacité comparable à celle du BCG. En outre, des résultats similaires ne pourront pas être obtenus tant que des supports adéquats pour l'administration n'aient été développés, et qu'une rétention correcte du matériel dans la vessie ne soit garantie.

Compte tenu de l'importance des cytokines dans l'efficacité de la BCG-thérapie, ainsi que de l'activité directe antitumorale de certaines cytokines, des études sont aussi en cours pour améliorer l'efficacité du traitement en associant BCG et cytokines. L'IL-2 et l'IFN- α semblent être les candidats les plus prometteurs et pourraient pallier aux échecs du BCG seul. D'autres expériences étudient l'utilisation d'une souche recombinante de BCG exprimant des cytokines, mais les essais *in vitro* ne sont pas encore concluants (Böhle et Brandau, 2003 ; Shah et McKiernan, 2004).

D'autres études menées actuellement incluent par exemple des traitements avec un vaccin à base d'ADN de BCG (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

➔ *Ainsi, l'emploi du BCG implique des risques non négligeables et certaines tumeurs restent réfractaires à son action. Ceci met donc en évidence la nécessité de développer des traitements aussi efficaces, voire plus, mais de toxicité moindre (Broghammer et Ratliff, 2002).*

1.2 Autres études :

1.2.1 L'hémocyanine de patelle

L'hémocyanine de patelle (KLH : keyhole limpet hemocyanin) est un pigment transporteur d'oxygène très immunogène, d'un mollusque appelé *Megathura Cranulata*. C'est un stimulant non spécifique du système immunitaire, qui a été étudié en administration intravésicale. Les études entreprises mettent en évidence une efficacité chez certains patients. L'avantage du KLH est l'absence apparente de toxicité. Il semble être une alternative d'immunothérapie intéressante. Il pourrait ainsi être un traitement idéal pour les patients avec une tumeur à risque faible ou moyen (Ta, grade 1-2), épargnant à de nombreux patients les effets indésirables du BCG. Le KLH offrirait aussi

une option thérapeutique pour les patients qui sont intolérants ou réfractaires au BCG. Cependant des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier la dose optimale et le protocole à utiliser. Des études sont aussi requises pour déterminer si le KLH apporte une protection contre la progression de la maladie comme avec la BCG-thérapie (Perabo et Muller, 2004).

1.2.2 Principaux autres agents étudiés

➤ Rubratine dérivée de *Nocardia rubra* :

Dans une étude réalisée par De Reijke *et al.* en 1997, 12 patients atteints de cancers superficiels de la vessie ont été traités avec des instillations intravésicales de Rubratine, une préparation à base de paroi cellulaire de *Nocardia rubra*. L'étude a révélé que la quantité de cellules immunitaires attirées dans la vessie semblait être moins importante que celle associée à la BCG thérapie, débouchant sur une production plus faible de cytokines. Cet agent présenterait donc moins d'intérêt.

➤ Bropirimine : (Perabo et Müller, 2004)

La bropirimine est une arylpyrimidine : c'est un immuno-modulateur à prise orale qui augmente la production endogène d'un certain nombre de cytokines, notamment l'IFN. Une étude clinique de phase II a été réalisée sur 41 patients pour évaluer l'efficacité de la bromopirimine par voie orale comme immunothérapie des CIS de la vessie (Akaza *et al.*, 1999, dans Perabo et Müller 2004). Chez 41,5 % des patients, il a été observé une réponse complète.

Les effets indésirables fréquemment observés étaient des symptômes « influenza-like » : fièvre, malaises, symptômes gastro-intestinaux comme anorexie, nausée/vomissements.

Un suivi des patients sur les années suivantes a révélé que le taux de non récurrence à un an était de 70,3%, et à 2 ans de 61,5%.

Cependant la production de Bropirimine a dû être arrêtée, le « Food and Drugs Administration Oncologic Drugs Advisory Committee » ayant refusé de donner son approbation, car la bropirimine présenterait une toxicité cardiaque non négligeable. Une étude clinique de phase III, entreprise en Europe par Witjes, König, Boeminghaus *et al.*, en 1999, a ainsi été arrêtée prématurément par le fabricant. Cette étude avait pour but de comparer la bropirimine *per os* et le BCG en intra-vésical (chez des patients n'ayant jamais reçu de BCG).

Au vu des résultats, cette nouvelle molécule immunomodulatrice est très prometteuse : elle semble avoir la même efficacité que le BCG et présente une voie d'administration pratique, puisqu'elle s'utilise par voie orale. Dans l'étude citée ci-dessus, 92% des patients ont présenté une réponse complète avec la bropirimine, contre 100% avec le BCG.

Cependant des investigations cliniques sont nécessaires, mais pour les raisons citées précédemment, elles sont actuellement en attente.

➤ Transforming-growth-factor-alpha-pseudomonas exotoxin-40 (TP-40) :

Il s'agit d'une protéine hybride obtenue par recombinaison génétique : elle consiste en une fusion du transforming growth factor alpha avec l'exotoxine-40 de *Pseudomonas*.

Cette protéine va se lier aux cellules cancéreuses qui expriment l'Epidermal-Growth-Factor-receptor (EGFR). TP-40 est alors internalisée, et va tuer ces cellules grâce à l'exotoxine.

Il n'y a qu'une étude de phase I qui ait été entreprise. Aucune toxicité n'a été observée. Ce traitement n'a pas montré d'effet antitumoral sur les patients avec des lésions T_a ou T₁, mais huit des neuf patients présentant un T_{is} ont développé une réponse (basée sur l'étude histologique avant et après traitement) (Perabo et Müller, 2004).

➤ Lectine de gui :

Madaus (Cologne, Allemagne) a développé une forme recombinante de lectine de gui comme potentiel agent d'immunothérapie anti-cancéreuse (Perabo et Müller, 2004).

Les lectines sont des globulines végétales qui se lient spécifiquement à différents oses sur la surface cellulaire et déterminent ainsi l'agglutination de cellules en culture *in vitro* ou de cellules libres telles que des cellules sanguines. Les lectines permettent par leur pouvoir agglutinogène de détecter des modifications de la surface cellulaire, liées à la différenciation, la croissance et la métaplasie. *In vitro*, la lectine de gui recombinante stimule la libération de cytokines et l'expression de marqueurs d'activation sur les lymphocytes, et induit l'apoptose des cellules cancéreuses.

2 Cytokines

Les cytokines sont des médiateurs naturels du système immunitaire, qui présentent une grande variété de fonctions biologiques allant de l'activation des cellules immunitaires (ex : interleukines, colony stimulating factors, interférons) à une action cytotoxique directe (ex : TNF- α). De nombreux essais cliniques ont été réalisés pour étudier l'effet anti-tumoral de cytokine recombinantes telles que IFN- α , IFN- γ , IL-2, et IL-12, utilisées seules ou associées. Malheureusement l'administration intraveineuse de cytokines s'est révélée gravement toxique voire létale (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Le problème a été surmonté par une administration intravésicale chez des patients atteints de cancers superficiels de la vessie. En effet des études ont démontré l'innocuité et l'efficacité de cette voie d'administration par rapport à la taille de la tumeur, la progression ou le taux de récurrences ; ces études incluant l'IFN- α , l'IFN- γ , l'IL-2 et le TNF (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

L'inconvénient de cette méthode est que ces cytokines recombinantes, produites par des bactéries, sont dépourvues des modifications post traductionnelles habituelles. Cela entraîne donc une perte d'efficacité due à une instabilité et une clairance accélérée. Cela implique alors de fortes concentrations, et des administrations répétées. De plus, l'immunothérapie par le BCG s'est révélée plus efficace.

Comme nous l'avons vu précédemment, une association BCG et cytokines (notamment IL-2 et IFN- α) est en cours d'évaluation. (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Les recherches s'orientent également aujourd'hui vers la thérapie génique et vers l'administration de gènes codant pour les cytokines localement ou directement dans les cellules tumorales, afin d'induire leur expression par les cellules tumorales elles même (Broghammer et Ratliff, 2002).

Les cytokines sont aussi utilisées comme adjuvant des vaccins anti-tumoraux (Broghammer et Ratliff, 2002).

2.1 Interférons

Les interférons participent à la réponse immunitaire par leurs propriétés antivirales, antiprolifératives et leur activité immunorégulatrice. (Perabo et Müller, 2004) Ils jouent un rôle important dans l'immunité antitumorale car ils augmentent l'expression des molécules du CMH de classe I et la présentation antigénique, activent les cellules NK, et pourraient inhiber directement la prolifération des cellules tumorales (Broghammer et Ratliff, 2002).

Comme l'IFN est le principal produit mis en évidence lors de la réussite du traitement par le BCG, il serait logique qu'une instillation directe d'IFN dans la vessie pourrait être utilisée pour le traitement. Différents sous-types d'IFN ont en fait été testés mais n'ont eu que des effets limités et la réponse à long terme reste clairement moins impressionnante que celle obtenue avec le BCG. Cela

indique que d'autres facteurs ou des associations de facteurs sont nécessaires pour un effet bénéfique maximal.

Giannopoulos *et al.* ont effectué une étude en 2003 sur 60 patients atteints de tumeurs superficielles et ayant subi une résection chirurgicale puis un traitement à base d'IFN- γ recombinant, par voie intravésicale. Sur les 60 patients ainsi traités, 74% ne présentèrent pas de récurrence dans les 25,6 mois du suivi, comparé à 52% pour les patients ayant reçu de la mitomycine C.

Le traitement à base de IFN- α -2b n'a donné que des résultats modestes sur les cancers de la vessie. Cette cytokine a été utilisée en combinaison avec le BCG pour améliorer la réponse T (Totterman *et al.*, 2005). Il semblerait que les administrations intravésicales d'IFN- α -2b soient plus efficaces en tant que traitement initial plutôt que comme un traitement de secours lorsque la BCG-thérapie a échoué. L'association avec la mytomycine-C a été également testée et semble donner des résultats bénéfiques (Perabo et Müller, 2004).

Les réactions indésirables après administration intravésicale d'IFN- α -2b sont plutôt modérées (symptômes grippaux ou fièvre, frissons, fatigue, myalgie) et ne concerne que 27% des patients. Il est donc mieux toléré que l'IL-2. De plus, ce genre d'effets indésirables ainsi que leur taux de survenue est identique à celui des autres agents utilisés dans les thérapies intravésicales, notamment les molécules de chimiothérapie (Giannopoulos *et al.*, 2003, Perabo et Müller, 2004).

→ *Les études sur le sujet sont restreintes mais de manière générale les résultats ne sont pas très encourageants et semblent indiquer que le BCG ou les molécules de chimiothérapie sont plus efficaces que l'IFN dans la prévention des récurrences (Perabo et Müller, 2004).*

2.2 Interleukine 2

L'interleukine-2, qui favorise la prolifération des cellules T, a été étudiée dans de nombreux essais. Son utilisation par voie systémique reste limitée par des forts taux de toxicité (Broghammer et Ratliff, 2002).

Cependant il a été démontré que l'IL-2 humaine recombinante, administrée par voie systémique, pouvait induire la régression de tumeurs solides chez certains patients. Comme c'est le cas avec les IFNs, la principale idée ayant fait suspecter une action possible de l'IL-2 sur les cancers de la vessie provient du rôle joué par les cytokines dans le mode d'action du BCG. Le problème actuel est de déterminer la dose et le protocole. Un grand nombre de protocoles a déjà été étudié, et les plans d'étude ont considérablement varié (Perabo et Müller, 2004).

2.3 Interleukine 12

L'interleukine-12 recombinante humaine induit la prolifération et l'activation des cellules T et des cellules NK, ainsi que la production d'IFN- γ .

A ce jour, une seule étude de phase I a évalué l'administration intravésicale d'IL-12 recombinante humaine sur des patients avec des tumeurs Tis, Ta ou T1 : l'étude a porté sur un traitement de 6 semaines, avec une administration par semaine, dont la dose variait suivant les groupes de patients. Aucun patient n'a présenté de toxicité systémique quelque soit la dose employée, et les effets indésirables incluaient : dysurie, pollakiurie et mictions impérieuses, douleur, hématurie, spasmes vésicaux et tremblements. Sur les douze patients qui n'avaient reçu aucun prétraitement, sept restèrent sains, et cinq développèrent une récurrence dans les quatre semaines. Trois patients ayant reçu un prétraitement et présentant des lésions Tis ou Ta/T1 étaient toujours atteints pendant la période de suivi post-traitement de quatre semaines (Weiss *et al.*, 2003).

2.4 Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

Plusieurs essais cliniques ont été conduits pour évaluer l'efficacité du TNF- α dans le traitement des cancers superficiels de la vessie. L'utilisation du TNF- α est très limitée du fait de sa forte toxicité, surtout cardiovasculaire, lorsqu'il est administré par voie systémique. Cependant une administration locale est dénuée d'effets toxiques significatifs et les tolérances systémique et locale sont excellentes, même aux doses les plus fortes. Les études de phase I et II suggèrent une efficacité même pour les cancers superficiels réfractaires. Mais d'autres études avec un nombre de cas plus grand, et des résultats à plus long terme sont nécessaires pour réellement évaluer ces données (Perabo et Müller 2004, Totterman *et al.*, 2005).

3 Thérapie immunogénique

Cette forme d'immunothérapie utilise le transfert de gènes induisant l'expression d'un immunomodulateur (par exemple une cytokine), chez les cellules tumorales ou les cellules normales du tissu environnant, ce qui entraîne alors une stimulation du système immunitaire.

L'avantage de la thérapie génique est la possibilité d'induire une expression d'immunomodulateur ciblée, maintenue, et contrôlée, au site tumoral. (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

L'inconvénient est que les vecteurs utilisés actuellement ne sont pas capables de traverser plusieurs couches cellulaires, ce qui limite leur utilisation au traitement des tumeurs superficielles de la vessie.

Le vecteur le plus couramment utilisé est un variant non répliquatif d'adénovirus. Ce virus pénètre dans une cellule cible *via* le coxsackie/adénovirus receptor (CAR) présent sur la membrane cellulaire. Le niveau d'expression de ce récepteur dans les cancers de la vessie reste très controversé, certaines études soutiennent que l'expression est réduite dans les lignées cellulaires de cancers de la vessie et que des vecteurs tels que le virus canarypox ou le virus vaccinia seraient de bonnes alternatives. Il semblerait que l'expression du CAR diminuerait avec le stade et le grade de la tumeur, ce qui impliquerait que l'adénovirus conviendrait uniquement pour les thérapies géniques dans le traitement des tumeurs superficielles de la vessie (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Une autre alternative est l'utilisation de vecteurs non-viraux. Des études sur un modèle murin orthotopique de cancer de la vessie ont montré un transfert de gène efficace et une réponse immunitaire anti-tumorale, en utilisant soit des liposomes transportant l'ADN codant pour les cytokines, soit un vecteur composé de polyéthylénimine et d'ADN codant pour p53 (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Le traitement des tumeurs vésicales par thérapie immunogénique est toujours dans une phase clinique précoce de développement. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la pénétration de la couche muqueuse, pour obtenir un transfert de gène plus efficace, et une expression améliorée du transgène (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Des résultats précliniques encourageants ont été publiés concernant une thérapie immunogène dirigée contre CD40 comme traitement des cancers de la vessie. CD40 est un membre de la famille des récepteurs au TNF, présent sur la membrane des cellules présentatrices d'antigène (CD et cellules B). Pour les CD, la liaison de CD40 avec son ligand (CD154 ou CD40L, exprimé sur les lymphocytes Th activés, les CTL, et les cellules NK) potentialise la présentation d'antigènes, augmente l'expression des molécules de costimulation et la libération de nombreuses cytokines. En plus de l'activité anti-tumorale, *via* la stimulation de la réponse cellulaire, la liaison au CD40 peut

aussi avoir un effet direct sur les cellules tumorales exprimant CD40 par l'apoptose induite par le CD40 (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

→ *La thérapie immunogénique semble prometteuse pour les cancers superficiels de la vessie, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour améliorer les résultats actuels.*

IV. ÉTUDE PARTICULIÈRE DE LA VACCINATION ANTI-TUMORALE

Parmi les différentes techniques d'immunothérapie, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la vaccination antitumorale, car elle a l'avantage de cibler directement les cellules tumorales, avec moins d'effets indésirables en comparaison à une technique d'immunothérapie non spécifique.

De nombreuses techniques de vaccination ont fait l'objet d'études afin d'en explorer leur innocuité et leur efficacité. Aucune toxicité n'a été mise en évidence jusque là, et les résultats cliniques sont prometteurs dans un grand nombre des stratégies vaccinales testées (Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Avant de pouvoir mettre en œuvre des essais de vaccination antitumorale, il a tout d'abord été nécessaire d'identifier des antigènes tumoraux spécifiques des cancers de la vessie.

1 Les principaux antigènes tumoraux des tumeurs vésicales chez l'homme

Dans cette partie nous allons faire la liste de tous les antigènes tumoraux mis en évidence dans les carcinomes transitionnels de la vessie chez l'homme, en détaillant les plus intéressants pour la vaccination anti-tumorale. L'*annexe 2* comprend la liste de tous les antigènes tumoraux des cancers de la vessie reconnus par des CTL, avec les épitopes qui ont déjà été identifiés.

La plupart des antigènes tumoraux mis en évidence au niveau des tumeurs vésicales et intéressants pour l'immunothérapie, font partie d'un groupe appelé les « **antigènes testiculaires du cancer** ». Ils sont, entre autre, représentés par les familles MAGE, NY-ESO-1, BAGE, et LAGE.

Ces antigènes testiculaires du cancer font partie de la classe la plus intéressante des antigènes tumoraux car ils ont la particularité d'être exprimés dans un grand nombre de tumeurs de différent type histologique, et d'être silencieux dans tous les tissus normaux, excepté dans la lignée germinale mâle et dans le placenta pour certains d'entre eux. Or comme les cellules germinales mâles et le placenta n'expriment pas les molécules du CMH de classe I, ils sont incapables de présenter des antigènes aux CTL. Cela en fait donc des cibles idéales pour la vaccination anti-tumorale, de par cette spécificité. L'inconvénient majeur à leur utilisation est la grande hétérogénéité de leur expression. La réussite d'une immunothérapie basée sur ces antigènes repose donc sur la mise au point de vaccins dirigés contre plusieurs antigènes (Fradet *et al.*, 2005).

L'expression des antigènes testiculaires du cancer semble être essentiellement régulée par la méthylation de l'ADN et leur expression dans les tissus néoplasiques semble être corrélée avec l'hypométhylation qui est fréquemment associée aux cancers. Ainsi il a été démontré que l'utilisation d'un inhibiteur des méthylases de l'ADN (tel que le 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-DC)) et/ou d'un inhibiteur des désacétylases des histones (tel que la trichostatine A), induisait efficacement l'expression de plusieurs antigènes testiculaires du cancer. Ces substances, associées à une stratégie de vaccination appropriée ciblant des antigènes testiculaires du cancer, pourrait permettre d'augmenter le nombre de tumeurs susceptibles d'être traitées par immunothérapie et améliorerait la réponse immunitaire (Fradet *et al.*, 2005).

1.1 Expression des antigènes du mélanome (MAGE)

La famille MAGE contient 24 gènes fonctionnels divisés en trois groupes nommés MAGE-A, B, et C. MAGE signifie « gènes du mélanome » car c'est dans ce type de tumeurs qu'ils ont été d'abord identifiés.

Les gènes de la famille MAGE sont particulièrement intéressants en immunothérapie car ils sont spécifiques de la tumeur. Par ailleurs, ils sont exprimés par un grand nombre de tumeurs. De nombreux peptides épitopes ont déjà été identifiés et offrent des perspectives multiples pour de futurs essais de vaccination antitumorale. Des essais cliniques de vaccination chez des patients atteints de mélanomes ont déjà été effectués avec des peptides de MAGE, et ont permis d'obtenir des régressions tumorales chez un petit nombre de patients (Zhang et al. 2002).

Les antigènes de MAGE sont connus pour être des antigènes de rejet tumoral reconnus par les CTL avec une restriction à un allèle HLA. Ainsi pour envisager la mise au point de vaccins utilisables chez un maximum de patients il est nécessaire de prendre en compte la molécule HLA par laquelle le peptide est présenté.

Il a été constaté que la proportion de tumeur exprimant un des trois gènes de MAGE (MAGE-A1 à A3) était plus élevée dans les tumeurs invasives ($\geq pT2$: 63 à 73%) par rapport à ce qu'on trouve au niveau des tumeurs superficielles ($\leq pT1$: 6 à 28%). (Nishiyama et al. 2001, Patard et al. 1995) Par contre si on prend en compte tous les antigènes de MAGE, les valeurs se rapprochent car d'après Fradet et al. (2005), 57% des tumeurs superficielles expriment (au moins) un gène de MAGE-A, contre 61% pour les tumeurs superficielles.

Par contre l'expression semblerait quand même corrélée avec le grade : l'expression de MAGE-A a en effet été observée dans 50 % des tumeurs G1 (1/2), 55% des tumeurs G2 (11/20) et 63% des tumeurs G3 (15/24). Enfin, 80% des tumeurs positives présenteraient un niveau d'expression moyen à élevé.

Nous allons à présent étudier les différents gènes de MAGE plus en détail.

➤ MAGE-A1, -A2, -A3 et -A4 :

Parmi les protéines de MAGE, l'expression de MAGE-A1 à MAGE-A4 a été examinée dans 57 échantillons de CCT primaire par Patard *et al.* (1995). Cette expression était présente dans 21% des CCT étudiés pour MAGE-A1, et dans 35% pour MAGE-A3. MAGE-A2 et MAGE-A4 sont exprimés respectivement par 30 et 33% des tumeurs. (Patard *et al.*, 1995)

Une étude effectuée par Brasseur sur l'expression de MAGE-A4 dans différents types tumoraux a donné les résultats suivants (Zhang *et al.*, 2002) :

- 23% des cancers superficiels de la vessie (stade inférieur à T2) expriment MAGE-A4 (étude sur 70 échantillons)
- 45% des cancers infiltrants de la vessie (T2) expriment MAGE-A4 (étude sur 53 échantillons) (33% d'après Patard et al. 1995)

Différentes études rapportées dans la littérature ont permis d'identifier plusieurs peptides antigéniques issus de MAGE-A4 reconnus par les CTL.

L'équipe de Tanaka *et al.* a identifié en 1997 un peptide codé par MAGE-3 associé à une molécule HLA-A24 capable d'induire des CTL. Ce peptide appelé IMPKAGLLI (position des acides aminés dans la séquence de MAGE-3 : 195-203 (soit MAGE-3₁₉₅₋₂₀₃)) est une cible potentielle pour la vaccination antitumorale des tumeurs vésicales exprimant MAGE-3 chez les patients HLA-A24. Il a d'ailleurs fait l'objet d'essais cliniques de vaccination antitumorale (voir plus loin).

D'autres peptides ont été identifiés mais n'ont pas fait l'objet d'essais de vaccination sur des patients cancéreux.

→ *MAGE-A1, 2, 3 et 4, sont les gènes qui ont été les plus étudiés et pour lesquels le plus grand nombre de peptides a été identifié. Ceci présente un intérêt pour la vaccination tumorale puisque il est envisagé dans l'avenir de vacciner les patients avec plusieurs peptides différents. Les nombreuses études ont en outre identifié des peptides restreints à différents types HLA, ce qui permettrait d'élargir le nombre de patients susceptibles d'être sélectionnés pour les essais vaccinaux.*

➤ MAGE-A8 :

En 2004, Bar-Haim *et al.* ont effectué une étude visant à rechercher les gènes surexprimés ou uniquement exprimés par les CCT en comparaison avec la muqueuse vésicale normale. Ils ont alors trouvé environ 480 gènes qui étaient exprimés au moins deux fois plus que dans le tissu vésical normal.

Leur intérêt s'est porté sur le gène MAGE-A8 car ils ont constaté que son expression était 7,8 fois supérieure à celle rencontrée dans les tissus normaux. D'autre part cette surexpression est fréquente puisqu'elle a été retrouvée dans 17 échantillons tumoraux sur 23 (soit 74%), et sur quatre lignées de CCT sur huit (50%). L'expression de ce gène n'a pas été détectée dans les échantillons de vessie et d'uretère normaux.

Selon la méthode d'immunologie inversée, ils ont identifié deux épitopes de CTL naturellement apprêtés par les tumeurs et restreints au HLA-A2.1 (Bar-Haim *et al.*, 2004).

➤ MAGE-A12 :

Après avoir identifié un peptide restreint au HLA-Cw7 et codé par le gène MAGE-A12, Heidecker *et al.* ont cherché à évaluer la fréquence de l'expression de MAGE-A12 au niveau des tumeurs vésicales. Ils ont donc étudié 70 échantillons de carcinomes vésicaux superficiels et 53 échantillons de carcinomes vésicaux invasifs. Ils ont alors constaté une expression de MAGE-A12 dans 10% des carcinomes superficiels et dans 34% des carcinomes invasifs de la vessie. (Heidecker *et al.* 2000). Ce peptide est à ce jour le seul qui ait été identifié pour MAGE-A12.

→ *L'intérêt des gènes de la famille MAGE est qu'ils sont assez fréquemment exprimés par les CCT, ont été très étudiés (de nombreux épitopes ont été identifiés) et des essais de vaccination ont déjà été entrepris, notamment pour le traitement du mélanome.*

1.2 Expression des gènes New York Esophageous 1 (NY-ESO-1) et du L antigène 1 (LAGE-1)

NY-ESO-1 est l'un des antigènes les plus immunogènes connus. Presque 50% des patients ayant une tumeur exprimant NY-ESO-1 présentent une réponse humorale détectable et des cellules T CD8+ réactives à cet antigène (Fradet *et al.*, 2005).

D'après Fradet *et al.* (2005) NY-ESO-1/LAGE-1 est exprimé par 8% des tumeurs superficielles et 26% des tumeurs invasives. Ils décrivent par ailleurs le niveau d'expression de ces gènes comme étant moyen à élevé. D'autres études ont révélé des résultats un peu différents. Ainsi Kurashige *et al.* (2001) ont trouvé que 28% des tumeurs superficielles et 38% des tumeurs invasives exprimaient NY-ESO-1. Fradet explique les résultats plus élevés obtenus dans ces deux études par l'utilisation de paramètres amplificateurs.

Fradet *et al.* (2005) ont également constaté que cette expression était corrélée au grade car 7 des 8 tumeurs positives étaient de grade 3. D'autres études ont aussi corrélié l'expression de ces gènes au grade tumoral, notamment Kurashige *et al.* (2001), qui ont constaté une expression dans aucune des tumeurs de grade 1 (0/4), dans 23% des tumeurs de grade 2 (6/26) et dans 44% des tumeurs de grade 3 (14/32). De même, Sharma *et al.* (2003) ont observé une expression de NY-ESO-1 ou/et de LAGE-1 dans 14% (3/22) des CCT de bas grade (pT1G1, pT1G2), et dans 48% (39/82) des CCT de haut grade (pCIS, pTaG3, pT1, pT2, pT3, pT4). Toutes les études s'accordent donc à dire que l'expression de NY-ESO-1 et LAGE-1 est plus fréquente dans les tumeurs de haut grade.

Kurashige *et al.* ont recherché la présence d'anticorps dirigés contre NY-ESO-1 chez 124 patients atteints de CCT, et ils ont constaté une séropositivité chez 12,5% (9/72) des patients ayant une tumeur de grade 3, mais aucune séropositivité chez les patients ayant une tumeur de grade 1 ou 2. Ils ont par ailleurs remarqué la persistance des anticorps chez des patients atteints de CIS après un traitement réussi, alors que dans les autres types tumoraux, les AC disparaissaient lorsque la tumeur était éliminée. Jäger *et al.* (2000) que chez les patients atteints de mélanomes, une réponse humorale dirigée contre NY-ESO-1 était prédictive d'une forte réponse T CD8+ dirigée contre des peptides de NY-ESO-1.

Cependant, lors de l'étude du sérum de chaque patient, Sharma *et al.* n'ont mis en évidence la présence d'anticorps dirigés contre NY-ESO-1 que chez un patient, dont la tumeur exprimait NY-ESO-1 de façon homogène. Ils expliquent cette différence dans la fréquence de séropositivité par le volume de la tumeur au moment du prélèvement sanguin, car dans leur étude les patients avaient déjà tous subi une RTUV, donc la taille de la tumeur était minimale au moment de l'étude. Des analyses plus poussées du patient séropositif, qui ne présentait toujours pas de signes de récurrence 24 mois après une cystectomie sur une tumeur pT4 de haut grade, a révélé la présence d'une immunité cellulaire T dirigée contre NY-ESO-1. Ils ont alors identifié l'épitope pour lequel les cellules T étaient spécifiques, et ont identifié un nouvel épitope de NY-ESO-1, p94-102, restreint au HLA-B35 (Sharma *et al.*, 2003).

→ La forte immunogénicité de NY-ESO-1 et son expression fréquente dans les CCT en font un candidat idéal pour la vaccination antitumorale.

1.3 Expression des antigènes B (BAGE)

D'après Fradet *et al.* (2005), BAGE-1, -4 et -5 sont les 2^{èmes} antigènes testiculaires du cancer les plus fréquemment rencontrés dans les cancers de la vessie. Leur ARN a été détecté dans 22% des tumeurs superficielles et dans 39% des tumeurs invasives de la vessie. D'après Fradet *et al.*, ces données sont comparables à ce qui avait été obtenu précédemment par Boel *et al.* Cependant, dans plus de 50% des tumeurs classées positives, le niveau d'expression était faible comparé à ce qui est observé au niveau des testicules.

L'expression de BAGE semblerait corrélée au grade : dans l'étude de Fradet *et al.* aucune des deux tumeurs G1 étudiées n'était positive, alors que 20% (4/20) des tumeurs G2 et 42 % (10/24) des tumeurs G3 exprimaient BAGE.

1.4 Autres antigènes mis en évidence

D'après Totterman *et al.* (2005), il existe d'autres antigènes associés aux cancers de la vessie, qui sont issus de variant de gènes suppresseurs de tumeur (p53, Rb) ou de variants d'oncogènes mutés (c-H-ras, c-myc, HER-2/neu).

1.4.1 Etude particulière de p53

Chez l'homme, la protéine p 53 est surexprimée dans les CCT. Or la surexpression des produits modifiés de p 53 ou de la protéine p53 sauvage peut conduire à une reconnaissance par le système immunitaire, et ainsi, p53 a souvent été considérée comme un antigène tumoral. (Ferriès *et al.*, 2001)

Des anticorps anti-p53 sont rencontrés chez 20% des patients cancéreux (tous types de cancer confondus). Une réponse T CD4⁺ dirigée contre p53 a déjà été mise en évidence dans les cancers du sein.

Plusieurs épitopes induisant une réponse T CD8⁺ ont été identifiés sur p53, dans une étude de Ferriès et al. en 2001. Les auteurs ont isolé plusieurs peptides issus de p53 et qui étaient associés à des molécules HLA diverses. L'étude a porté sur 16 patients atteints de CCT et de 7 patients sains. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) fraîchement récoltées furent mis en présence des peptides issus de p53 ; ces peptides étant associés au HLA correspondant de chaque patient. La réactivité des cellules T en présence des complexes peptide-HLA a été évaluée par la détection d'une sécrétion d'IFN- γ .

Deux patients parmi les 16 présentaient une accumulation de p53, ainsi qu'un 3^{ème} mais de façon moins importante pour ce dernier. Il s'est avéré qu'aucune réponse n'était détectable chez les donneurs sains et chez les patients atteints de CCT mais ayant un niveau faible ou indétectable de p53 dans leurs cellules tumorales. En revanche les cellules T des patients ayant une accumulation de p53 dans leurs cellules tumorales ont présenté une sécrétion d'IFN- γ en présence de certains peptides (Voir *tableau 8* page 88).

Tableau 8 : Résultats de l'étude effectuée par Ferriès *et al.* (2001), visant à identifier les peptides de p53 reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ de patients atteints de cancers de la vessie.

N° du patient	Peptides ayant engendré une sécrétion de IFN- γ par les cellules T du donneur	Molécule HLA auxquelles étaient associés les peptides
1	149-157	HLA-A2
	264-272	HLA-A2
	194-203	HLA-B51
3	204-212	HLA-A24
	211-218	HLA-A24
	235-243	HLA-A24

La tolérance à p53 pourrait poser problème dans le développement d'une réponse immunitaire contre p53. Comme la présence de cellules T anti-p53 a pu être détectée, cela veut dire que ces cellules T n'ont pas été délétées pendant l'ontogenèse. Probablement parce que seules les cellules T de forte avidité sont délétées.

Contrairement à ce que l'on rencontre chez les patients cancéreux, l'obtention de lignées de cellules T cytotoxiques à partir de PBMCs de donneurs sains, requiert plusieurs stimulations *in vitro*. Cela conforte l'idée d'une très faible fréquence des précurseurs en périphérie. Les auteurs soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'induction des cellules T spécifiques de p53 et leur expansion chez les patients cancéreux pourraient être dus à des processus post-traductionnels de p53 qui diffèrent au niveau des cellules tumorales.

Plusieurs auteurs ont démontré l'existence d'une tolérance à p53 mais des études sur des souris ont montré qu'il était possible de contourner cette tolérance.

De plus, des transferts adoptifs de cellules T spécifiques de la forme sauvage de p53, des injections de cellules dendritiques pulsées avec des peptides de p53, ou des cellules dendritiques transduites avec un gène de p53 sauvage sont tous capable d'induire des rejets tumoraux, sans infliger de dommages notables aux tissus normaux.

Cependant, l'utilisation de vaccins anti-cancéreux incluant de nombreux épitopes pourrait être nécessaire pour prévenir un échappement tumoral. Ainsi l'identification de plusieurs nouveaux épitopes par Ferrière *et al.* (2001) apporte une réelle opportunité pour le développement d'une immunothérapie ciblant p53 chez un grand nombre de patients.

1.4.2 Etude particulière de KIAA0205

Un autre antigène de carcinome de la vessie a été identifié par des CTL autologues, restreintes au HLA-B4403. L'antigène a pour origine une mutation ponctuelle au niveau d'une protéine exprimée de façon ubiquitaire et qui est nommée KIAA0205. Le rôle de cette protéine n'est pas connu. La mutation ponctuelle n'a pas été identifiée lors de l'étude de plus de cent autres types de tumeurs, ni dans 50 autres tumeurs vésicales, ce qui signifie que cette mutation serait spécifique de la lignée cellulaire étudiée, à savoir : LB831-BLC. Cette étude est néanmoins importante car elle a été la première à décrire l'isolement de clones de CTLs dirigés contre des cellules tumorales de vessie chez l'homme et la première caractérisation moléculaire d'un antigène tumoral (Gueguen *et al.*, 1998).

1.4.3 Autres antigènes

La liste complète des antigènes tumoraux exprimés par les cancers de la vessie se trouve en **Annexe 2**.

→ *Les cancers de la vessie expriment plusieurs antigènes spécifiques de tumeur, incluant de nombreux antigènes des cancers des testicules tels que MAGE-3, MAGE-8, MAGE-A12, et NY-ESO-1 mais aussi p53 mutée. Ces antigènes constituent des cibles pour la vaccination antitumorale (Schenk-Braat et Bangma, 2005). Les antigènes de la famille MAGE sont les plus fréquemment exprimés par les tumeurs vésicales et constituent ainsi des cibles de choix pour l'immunothérapie anticancéreuse.*

2 Essais de vaccination déjà réalisés chez l'homme et résultats

Il n'existe que deux études cliniques qui ont été reportées dans la littérature jusqu'à ce jour.

Dans une étude effectuée par Nishiyama *et al.* en 2001, quatre patients atteints de cancers avancés de la vessie exprimant MAGE-3 ont été traités avec des cellules dendritiques autologues pulsées avec un peptide de MAGE-3 (IMPKAGLLI) présenté par une molécule HLA-A24. Ces patients avaient déjà subi une chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Aucun d'entre eux n'a présenté d'effets secondaires graves. Une diminution significative de la taille des nœuds lymphatiques métastatiques et/ou des métastases hépatiques a été obtenue chez trois patients sur quatre : deux des patients ont présenté une réponse partielle, et l'un d'entre eux a présenté une réponse complète (Nishiyama *et al.*, 2001).

Une autre étude a été réalisée en 2003 par Marchand *et al.* Dans cette étude, trois patients atteints de CCT métastasés exprimant MAGE-3, ont été vaccinés avec des doses croissantes de protéine MAGE-3 recombinante, associées à une dose fixe d'adjuvant immunologique appelé SBAS-2 (SmithKline Beecham Biological Adjuvant System -2). Le protocole contenait quatre vaccinations par voie intramusculaire à trois semaines d'intervalle. Le vaccin a été globalement bien toléré. Une réponse partielle a été observée chez un de ces trois patients atteints de CCT : les deux nœuds lymphatiques métastatiques, qui avaient continué à croître malgré deux protocoles de chimiothérapie, ont régressé presque complètement au bout de 7 mois. L'un d'entre eux est devenu

indétectable cliniquement et l'autre a été retiré chirurgicalement. Une rechute de la tumeur est survenue deux mois plus tard (Marchand *et al.*, 2003).

Il existe une troisième étude en cours de réalisation : un essai clinique de phase I, qui a lieu actuellement aux USA, et qui étudie l'efficacité de la vaccination comme traitement adjuvant de la chirurgie de la vessie. Cet essai, organisé au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, par l'équipe de Sharma *et al.* (2003), concerne la vaccination par injection de l'antigène des cancers des testicules NY-ESO-1 en association avec le BCG et le GM-CSF comme traitement adjuvant pour les patients ayant subi une cystectomie sur un CCT de haut grade (Sharma *et al.*, 2003, Schenk-Braat et Bangma, 2005).

Un essai clinique de phase II actuellement en cours, est répertorié sur le site Internet du National Cancer Institute. Il a été entrepris par Slaviv et Carmon. Il utilise un nouveau vaccin pour le traitement des cancers exprimant MUC-1, dont, entre autres le CCT. Le but de cette étude est d'évaluer l'innocuité et l'efficacité initiale de ImMucin, un nouveau vaccin peptidique, sur des tumeurs métastasées exprimant l'antigène tumoral MUC-1 (National Cancer Institute, 2006).

Enfin, ce même site rapporte un autre essai en cours, un essai de phase I, qui est une étude randomisée sur l'utilisation de la protéine NY-ESO-1 associée à un immunoadjuvant CpG 7909 et du Montanide®ISA-51, chez des patients présentant une tumeur exprimant NY-ESO-1. Cette étude se déroule au Cancer Institute du New York University Medical Center, par Bhardwaj *et al.* (National Cancer Institute, 2006).

Des essais précliniques sur animaux de laboratoires ont aussi été menés, notamment un essai de vaccination avec des cellules dendritiques pulsées avec la protéine p53 mutante, et un essai avec la forme mutée de la protéine ras p21 associée à de l'IL-12, qui ont donné des résultats encourageants (Broghammer et Ratliff, 2002).

3 Discussion et perspectives

Globalement le taux de réussite est plutôt limité. En effet dans les différents essais de vaccination ciblant les antigènes testiculaires du cancer déjà réalisés (dans les essais concernant des cancers de la vessie ou d'autres types de cancers), moins de 20% des patients ont montré une régression tumorale après avoir été vacciné.

D'après Fradet *et al.* (2005) cet échec dans l'obtention d'une réponse clinique pourrait avoir deux causes majeures : l'impossibilité d'induire une réponse T significative ou la résistance de la tumeur à l'attaque immunologique. Alors que la première cause pourrait être éventuellement résolue par une formule vaccinale plus efficace, la seconde nécessiterait une meilleure caractérisation de la tumeur de chaque patient et de son statut immunitaire.

Nishiyama *et al.* (2001) précisent eux aussi que malgré leurs résultats encourageants, de nombreuses inquiétudes persistent concernant l'application de l'utilisation des CD en clinique. La plupart des patients atteints de cancers évolutifs ayant en effet de fortes chances d'avoir un âge avancé et un statut immunologique déficient. Des thérapies associant les CD et l'administration systémique de cytokines seraient d'après eux une des solutions possibles.

En effet l'IL-12 est connue pour être capable d'induire des CTL chez des patients avec un système immunitaire affaibli, et d'autre part, l'utilisation concomitante d'IL-12 pourrait permettre de réduire les doses de CD nécessaires. Nishiyama *et al.* ont d'ailleurs démontré dans une étude *in vitro*, que lorsque l'IL-12 était utilisée pour stimuler les cellules effectrices issues des PBMCs mises en contact avec les CD pulsées avec le peptide de MAGE-3, l'activité CTL obtenue était significativement plus forte que celle obtenue sans IL-12.

D'autre part, il a été démontré que seulement 35% des CCT exprimaient par exemple MAGE-3. Les pourcentages sont du même ordre voire plus faibles pour les autres antigènes tumoraux. Cela limite donc le nombre de patients pouvant être inclus dans les essais. D'autant plus qu'il faut prendre en compte l'allèle HLA du patient. A ce sujet, Fradet *et al.* ont démontré la capacité du 5-AZA-DC à induire l'expression des gènes testiculaires du cancer par les lignées de cellules de cancer de la vessie. Coral *et al.* (2002) ont montré que l'obtention d'une néo-expression de NY-ESO-1 sur des cellules de carcinome rénal grâce au traitement par le 5-AZA-DC, pouvait mener à une lyse efficace par les CTL spécifiques de NY-ESO-1 et qu'un tel traitement pouvait aussi entraîner une expression plus importante des molécules HLA de classe I et des molécules de co-stimulation. Ainsi le 5-AZA-DC (également connu sous le nom de Décitabine) avec une stratégie vaccinale visant à induire une réponse immunitaire efficace contre les antigènes testiculaires du cancer pourrait permettre (Fradet *et al.*, 2005) :

- 1) d'augmenter le nombre de tumeurs potentiellement ciblées par l'immunochimiothérapie,
- 2) d'améliorer la présentation antigénique par les molécules HLA de classe I,
- 3) en apportant probablement le moyen de contourner les mécanismes d'échappement tumoral : en ré-induisant l'expression d'antigènes chez les variants cellulaires n'exprimant pas l'antigène ou ayant perdu l'expression de l'antigène.

Enfin pour pallier à la résistance tumorale, il est nécessaire de développer des vaccins dirigés contre plusieurs antigènes différents. De tels vaccins pourraient en effet améliorer l'efficacité antitumorale primaire du vaccin et réduire le risque d'échappement tumoral par perte d'expression d'un antigène. Pour cela l'identification d'un grand nombre de combinaisons peptides/HLA est nécessaire. Par ailleurs, cela permet d'élargir le nombre de patients remplissant les conditions requises pour être vaccinés (Kobayashi *et al.*, 2003). C'est le cas des antigènes testiculaires du cancer qui ont été très étudiés et pour lesquels on a identifié un grand nombre de combinaisons peptide-HLA. Cela en fait des cibles très prometteuses pour le traitement des cancers de la vessie par vaccination antitumorale.

V. L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS VESICALES CHEZ LE CHIEN

Les études d'immunothérapies effectuées chez le chien dans le cadre du traitement des cancers de la vessie sont très peu nombreuses. Les rares essais répertoriés ne sont pas récents.

Tout d'abord, Norris *et al.* (1992) rapportent l'utilisation d'interférons sur un chien atteint de CCT de stade T₂N₀M₀. Le traitement à base d'interféron, dont la dose n'est pas spécifiée, n'a donné aucun résultat.

Des tentatives de traitement utilisant des préparations à base de paroi cellulaire de BCG injectées au sein même de la lésion, au moment de l'excision partielle, ont donné des résultats très variables. Deux des sept chiens traités de cette façon ont semblé présenter une amélioration après cette thérapie intralésionnelle, mais deux autres chiens ont présenté une réaction granulomateuse sévère qui a abouti à une obstruction complète. Cette étude a été rapportée par MacEwen et Matus en 1983 (Withrow, 1996).

Enfin plusieurs autres études sur le BCG par voie intravésicale ont été entreprises, mais elles ont peu d'intérêt ici puisqu'elles étaient juste des études de toxicité, c'est-à-dire qu'elles avaient pour but d'évaluer les effets de ce traitement appliqué à des vessies saines.

Le BCG reste actuellement le traitement le plus efficace pour la prévention des récurrences et de la progression des cancers superficiels de la vessie. De nombreux autres agents ont été évalués en essais cliniques de phase I et II mais il y a un manque de données à long terme sur la prévention des récurrences, et le temps de survie.

La vaccination antitumorale semble très prometteuse, même si les résultats actuels restent encore assez mitigés. Il reste notamment à définir les techniques et protocoles optimaux, et pour cela un modèle animal adéquat est requis. Il restera aussi ensuite à tester cette technique sur un plus grand nombre de patients pour pouvoir obtenir des résultats comparables.

Chez le chien les essais d'immunothérapie sont très peu nombreux.

4^{ème} partie : SYNTHÈSE : ÉTUDE DU CHIEN COMME MODÈLE D'ÉTUDE POSSIBLE POUR LA VACCINATION ANTITUMORALE.

I. NECESSITE D'UN NOUVEAU MODÈLE ET INTERET DU CHIEN

1 Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cancers de la vessie chez l'homme

Nous avons pu constater précédemment que de nouveaux traitements plus efficaces étaient clairement requis. Tout d'abord, le nombre de décès causés par les cancers de la vessie, et les récurrences et/ou les progressions tumorales après résection transurétrale sont encore trop fréquentes pour les tumeurs superficielles. Si le BCG est le traitement le plus efficace, il présente tout de même des limites non négligeables, qui sont l'existence de patients réfractaires et une toxicité importante. Pour ce qui est des cancers invasifs et/ou métastasés les résultats des traitements actuels sont également « imparfaits ». Il serait intéressant de trouver des traitements plus efficaces ne serait-ce que pour éviter d'avoir recours à la cystectomie radicale qui entraîne encore beaucoup de complications et détériore les conditions de vie.

De nombreuses recherches ont permis d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouvelles cibles pour les traitements. Avant de pouvoir les appliquer à l'homme et d'entreprendre des essais cliniques, il est nécessaire de tester leur efficacité et leur innocuité sur des modèles animaux adéquats.

Parmi ces traitements à l'étude nous nous sommes particulièrement intéressés à la vaccination antitumorale. Cette partie vise donc à étudier la possibilité d'utiliser le chien comme modèle pour étudier cette nouvelle technique et les moyens pour la mettre en œuvre.

2 Limites des modèles murins et intérêt du chien comme modèle d'étude

De nombreux modèles expérimentaux de cancer de la vessie chez les rongeurs ont été étudiés.

Des carcinogènes chimiques tels que le N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine par exemple, ont été utilisés pour induire des tumeurs de la vessie chez le rat et la souris. En effet après exposition au N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, les souris développent des carcinomes nodulaires invasifs, précédé du stade de carcinome *in situ*, et les rats développent des masses polypôides exophytiques avec invasion tardive. Bien que ces modèles apportent des informations utiles concernant le risque lié à l'exposition chimique et la carcinogenèse, ils présentent des limites à cause du faible taux d'expansion métastatique. Or le développement de stratégies pour traiter ou prévenir les métastases, est actuellement un des plus gros challenge de la thérapie anticancéreuse.

Un autre type de modèle de rongeur peut être créé par implantation orthotopique de cellules de tumeur vésicale chez des souris athymiques. Des lignées cellulaires ont ainsi été créées, produisant 100% de tumeurs primaires chez la souris et des métastases pulmonaires chez 30% d'entre elles (Knapp *et al.*, 2000).

Mais bien que ces systèmes de modèles *in vitro* apportent des informations importantes sur les processus moléculaires et cellulaires, des modèles vivants, avec des processus physiologiques intacts (tels que leur système immunitaire, les mécanismes d'angiogénèse, et les multiples interactions entre les organes) sont clairement nécessaires (Knapp *et al.*, 2000).

Le cancer spontané de la vessie du chien constitue un autre modèle animal envisageable. De plus ce modèle présente de nombreux avantages qui sont les suivants :

- Les similitudes entre les types spécifiques de cancers canins et humains, du point de vue de leurs caractéristiques histopathologiques, de leur comportement biologique, et de leur réponse aux thérapeutiques,
- Le métabolisme des médicaments, qui est similaire chez l'homme et le chien,
- Le peu de contraintes pour tester de nouvelles thérapies, puisque les thérapies « standards » ne sont pas réellement bien définies dans beaucoup de cancers canins,
- La durée de vie du chien,
- Le fait que les chiens partagent le même environnement que leurs propriétaires et donc ont les mêmes sources d'exposition comme l'eau, le tabagisme passif, les insecticides...
- La plus grande taille des chiens par rapport aux rongeurs, ce qui rend certaines procédures médicales techniquement réalisables (notamment les instillations intravésicales), et le contrôle d'évolution clinique post-thérapeutique aisé (par exemple, contrôle de la progression tumorale et la régression possible par endoscopie)
- Le concept suivant lequel les nouvelles stratégies interventionnelles développées *in vitro* ou dans des études sur animaux de laboratoire peuvent être testées *in vivo* sur des chiens atteints de cancer spontané, alors que des études similaires pourraient être inacceptables ou difficilement faisables chez des humains atteints de cancers, surtout lorsqu'un traitement standard existe déjà, et même s'il n'est que partiellement efficace.

L'étude du cancer spontané chez l'animal est en effet plus acceptable dans une société soucieuse du bien-être animal, que l'induction de maladies chez les animaux pour servir la recherche. De plus les études comparatives réalisées chez l'animal se révèlent clairement bénéfiques à la fois pour l'homme et pour l'animal (Knapp *et al.*, 2000, Ostrander et Giniger, 1997).

Le modèle canin constitue un modèle complémentaire aux modèles de rongeurs existants. En effet, les modèles de rongeurs se prêtent bien à l'étude du développement d'une tumeur et de sa progression, en réponse à des carcinogènes chimiques, ainsi qu'à l'étude de stratégies interventionnelles pouvant être mises en place au moment où se déroulent ces processus précoces (Knapp *et al.*, 2000).

Grâce aux connaissances actuelles sur le CCT du chien, il est évident que celui-ci constitue un meilleur modèle pour l'étude des événements plus tardifs de la progression tumorale tels que la résistance aux médicaments et le développement de métastases. De plus, le CCT canin se développe dans une population âgée, mais toujours immunocompétente, génétiquement diversifiée, et qui est donc similaire, de ce point de vue, à la population humaine concernée. La disponibilité d'un grand nombre de sujets et le faible coût sont des avantages majeurs pour les modèles de rongeurs.

II. SIMILITUDES DES CANCERS DE LA VESSIE HOMME/CHIEN ET PERSPECTIVES

Comme il a été démontré précédemment, le chien présente toutes les caractéristiques d'un bon modèle animal, et le carcinome transitionnel spontané du chien présente de fortes similitudes avec les cancers invasifs de la vessie rencontrés chez l'homme.

En effet, le cancer superficiel est peu fréquent chez le chien, bien qu'il représente environ 80% des cancers de la vessie chez l'homme. Comme nous l'avons vu précédemment, Knapp *et al.* (2000) ont émis l'hypothèse que le cancer superficiel n'existerait pas chez le chien.

L'étude du CCT du chien pourrait permettre de chercher à résoudre de nombreuses questions concernant les cancers invasifs de la vessie chez l'homme telles que :

- Comment pourrions-nous prévenir le développement d'un cancer de la vessie ?
- Pourquoi certaines personnes sans aucun facteur de risque développent-elles un cancer de la vessie, ou quels sont les facteurs de risque non encore identifiés ?
- Comment prévenir la progression d'un CCT invasif ?

- Comment prévenir la formation de métastases ?
- Comment traiter plus efficacement les métastases déjà existantes ?

Cela pourrait en effet être utile pour la recherche de facteurs de risques encore non identifiés. Par exemple il a été constaté que la présence dans des zones traitées aux produits insecticides était un facteur de risque chez le chien. Il serait possible alors de rechercher une fixation de substances inertes issues de ces produits dans les cellules adipeuses des patients, ou d'étudier les populations à risque tels que les vétérinaires ou ASV qui appliquent fréquemment des insecticides sur les animaux.

D'autre part l'étude des races prédisposées pourrait permettre d'identifier les facteurs génétiques importants pour l'initiation d'un cancer de la vessie et son développement (Ostrander et Giniger, 1997).

Enfin, et c'est ce qui nous intéresse en premier lieu dans cette étude bibliographique, le cancer de la vessie du chien pourrait aider à trouver comment traiter plus efficacement voire prévenir les cancers métastasés de la vessie. Dans la série de 102 chiens étudiée par Knapp et al. en 2000, des métastases étaient présentes chez 14% des chiens au moment du diagnostic et chez 49% d'entre eux au moment de leur mort. Si un contrôle plus efficace de la tumeur primitive était mis en place et une obstruction urétrale évitée, un plus grand nombre de chiens auraient le temps de développer en fin de compte des métastases, procurant ainsi des sujets idéaux pour l'étude des thérapies anti-métastatiques (Knapp *et al.*, 2000).

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la faisabilité de l'expérimentation de la vaccination antitumorale sur le modèle canin. Pour cela, il faut connaître les antigènes spécifiques des carcinomes transitionnels canins afin de trouver des cibles potentielles pour cette vaccination. Il faut également comparer ces antigènes avec ceux décrits chez l'homme afin de focaliser l'étude sur les antigènes communs aux deux espèces, pour que les essais sur le chien soient reproductibles ensuite chez l'homme. Et enfin, il va falloir étudier leur antigénicité, c'est-à-dire évaluer leur capacité à induire une réponse immunitaire spécifique.

III. ANTIGENES SPECIFIQUES DES TUMEURS VESICALES DECRITS CHEZ LE CHIEN

Les études immunohistochimiques effectuées sur les tumeurs vésicales de chien sont très peu nombreuses dans la littérature, en comparaison aux études effectuées chez l'homme. Il n'y a donc que très peu d'antigènes spécifiques des tumeurs vésicales de chien qui aient été mis en évidence à ce jour.

1 Mise en évidence d'un antigène commun à l'homme et au chien, reconnu par l'anticorps monoclonal de rat RS-11

Une étude réalisée par Eto *et al.* en 1989 met en évidence un antigène commun à plusieurs espèces et reconnu par un anticorps monoclonal de rat. Cet anticorps (nommé RS-11) a été obtenu par immunisation syngénique avec des cellules de tumeurs vésicales de rat, induites au N-butyl, N-hydroxybutylnitrosamine.

Les auteurs ont constaté que RS-11 réagissait avec les tumeurs vésicales de souris, rat, chien, et homme, mais qu'il ne réagissait pas avec l'urothélium normal humain ou avec les tissus normaux du rat. De plus, RS-11 réagit avec des lignées cellulaires de différentes origines : tumeurs épithéliales, neuro-épithéliales, ou mésenchymateuses. Il réagit aussi sur des tumeurs humaines comme les méningiomes, les tumeurs des cellules germinales, les carcinomes transitionnels et les carcinomes à cellules squameuses.

L'antigène concerné serait exprimé par la plupart des carcinomes transitionnels de bas grade et par les carcinomes à cellules squameuses bien différenciés, mais pas par les tumeurs invasives de stade avancé. RS-11 pourrait donc refléter un certain degré de malignité ou de différenciation.

L'étude suggère que l'épitope pourrait être localisé sur le cytosquelette, mais la distribution antigénique et le schéma de coloration obtenus sont différents de toutes les protéines du cytosquelette connus.

Un des intérêts de cette étude est que l'épitope de l'anticorps utilisé est différent de ceux des ACm dressés contre des cellules tumorales xénogéniques, car le système immunitaire syngénique peut en effet reconnaître des antigénicités mineures qui ne sont pas reconnues par des systèmes immunitaires xénogéniques. L'intérêt majeur pour notre étude est que cet anticorps est dirigé contre un épitope retrouvé dans certaines cellules des tumeurs vésicales à la fois chez l'homme et chez le chien. Il pourrait alors faire l'objet d'étude de vaccination mais il faudrait d'abord identifier précisément l'épitope et évaluer son antigénicité.

2 Expression de la glycoprotéine associée aux tumeurs 72 : TAG 72

Une autre étude de Clemo *et al.*, datant de 1995, a étudié l'immunoréactivité du carcinome transitionnel de la vessie du chien, à l'aide de trois AC monoclonaux (B72.3, CC49 et CC83) dirigés contre la glycoprotéine 72 associée aux tumeurs (également appelée TAG 72 : Tumor-Associated Glycoprotein 72). TAG 72 est un antigène mucine-like, de haut poids moléculaire, exprimé dans une grande variété de carcinomes humains. Chez l'homme, B72.3 est utilisé comme marqueur des cellules épithéliales néoplasiques dans les épanchements ou dans les cytoponctions. Le but de cette étude était de déterminer si B72.3 pouvait être utilisé comme marqueur de cellules néoplasiques dans les urines de chiens.

L'étude a porté sur 51 carcinomes transitionnels de la vessie, sur 15 vessies hyperplasiques/inflammatoires, et sur 8 parois vésicales normales. Les résultats furent les suivants :

- 53% des CCT étaient positifs à B72.3, sans corrélation avec des signes de malignité
- 53% des CCT étaient positifs à CC49
- 63% des CCT étaient positifs à CC83
- vessie normale ou inflammatoire : aucun positif

Il est possible, d'après l'auteur, que les résultats négatifs obtenus dans certains CCT soient dus à un manque de sensibilité de la méthode utilisée pour la coloration.

Ainsi, la coloration du CCT du chien avec les trois AC monoclonaux dirigés contre TAG 72 est spécifique des cellules urothéliales néoplasiques, et un antigène similaire à TAG 72 est donc exprimé par le CCT du chien. Les auteurs ont par ailleurs constaté que la coloration était le plus souvent observée dans le cytoplasme des cellules.

Il semblerait que CC49 ait une affinité plus forte pour le CCT canin par rapport à B72.3. D'autres investigations ont révélé que CC49 présentait une immunoréactivité plus forte que B72.3 dans de nombreux types de carcinomes humains ; l'épitope visé serait donc plus abondant ou plus accessible. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir utiliser cet épitope dans le diagnostic vétérinaire ou la thérapeutique.

L'intérêt de cet antigène pour notre étude est qu'il est commun à l'homme et au chien. Cependant aucune étude évaluant son immunogénicité n'a été réalisée et on ne peut donc pas savoir si cet antigène pourrait servir de cible pour la vaccination antitumorale. D'autres études sont donc requises pour éclaircir ce point.

3 Expression des cytokératines 7 et 20, et de l'uroplakine III

La majorité des tumeurs vésicales sont des tumeurs de type épithéliale. Or les cytokératines sont des marqueurs des cellules épithéliales. La caractérisation immunohistochimique des néoplasmes épithéliaux de la vessie a été réalisée dans de nombreuses études, à l'aide d'anti-corps dirigés contre les cytokératines. Le CCT de la vessie exprime les cytokératines d'un épithélium simple : (CK 7, 8, 18, 19, 20) et les cytokératines des épithéliums stratifiés (CK 13 et 17). Les cytokératines les plus couramment utilisées en pathologie humaine pour distinguer les carcinomes urothéliaux des autres carcinomes sont les cytokines 7 et 20 (Ramos-Vara *et al.*, 2003).

D'autre part les cellules superficielles, qui constituent la couche superficielle de l'urothélium, sont dotées d'une membrane plasmique spécialisée formant des plaques d'apparence rigide, couvrant la partie apicale de l'urothélium. Ces plaques, dont la partie intraluminaire est plus fine que la partie extracellulaire, forment ce que l'on appelle les unités membranaires asymétriques (asymmetric unit membranes : AUM). Les composants majeurs de ces AUM sont des protéines transmembranaires appelées « uroplakines ». Ces uroplakines sont très conservées d'une espèce de mammifère à une autre, et notamment entre l'homme et le chien (entre autre). Par ailleurs les uroplakines sont spécifiques de l'épithélium transitionnel et de ses tumeurs d'où son intérêt dans notre étude.

Ramos-Vara *et al.* ont effectué une étude en 2003, visant à caractériser l'immunoréactivité des anticorps monoclonaux dirigés contre l'uroplakine III (UP III) et les cytokératines 7 et 20 (CK) au niveau des tumeurs urothéliales canine. L'étude immunohistochimique a porté sur 65 tumeurs de vessie de chien, dont 55 carcinomes transitionnels.

➤ L'UP III :

Il s'est avéré que l'UP III était exprimée au niveau de l'urothélium normal et des tumeurs urothéliales. 91% des CCT (53/55) étaient positifs. C'est en fait uniquement la localisation qui différait entre l'urothélium normal et l'urothélium néoplasique :

- les cellules néoplasiques présentaient une coloration de la membrane plasmique sans polarité alors que l'urothélium normal était coloré de façon intense au niveau de la membrane apicale,
- les cellules normales présentaient une coloration diffuse du cytoplasme, qui était très rarement rencontrée au sein du tissu normal.

Par ailleurs les tumeurs non épithéliales et les tissus normaux non épithéliaux se sont tous révélés négatifs.

L'UP III peut ainsi être considérée comme un marqueur spécifique et sensible du CCT canin (Ramos-Vara *et al.*, 2003).

Si on compare cela avec ce que l'on trouve chez l'homme, deux études ont permis de révéler que les anticorps dirigés contre les UP marquaient les CCT humains dans environ 53 à 88% des cas. Les uroplakines sont donc considérées, comme des marqueurs histologiques très spécifiques et modérément sensibles des tumeurs urothéliales primitives et métastatiques chez l'homme (Kaufmann *et al.*, 2000 ; Ramos-Vara *et al.*, 2003).

Le souci par rapport aux objectifs de cette étude est que l'UPIII est présente sur l'urothélium néoplasique mais aussi sur l'urothélium normal, ce qui compromet son utilisation comme cible thérapeutique. L'UP III ne peut donc être utilisée que comme marqueur dans un but diagnostique.

➤ Les CK 7 et 20 :

Les CCT canins étaient positifs pour CK 7 et CK 20 dans 98,1% (53/55) et 68,5% (37/55) des cas respectivement. Ainsi CK 7 est plus sensible que UP III. Le seul TCC anaplasique était négatif pour les 2 types de cytokératines. De même que pour les uroplakines, les cellules urothéliales normales sont également positives, présentant une coloration diffuse du cytoplasme ; la coloration liée à CK 20 est plus faible que pour les autres marqueurs. Chez l'homme, CK 7 est détectée immunohistochimiquement dans 82 à 100% des CCT (Bassily *et al.*, 2000). D'autre part ces marqueurs sont moins spécifiques que l'UP car ils sont aussi exprimés dans de nombreuses tumeurs non urothéliales, ainsi que dans des tissus normaux et certaines tumeurs canines (Ramos-Vara *et al.*, 2003).

→ *Ces marqueurs ne peuvent donc pas être utilisés dans un but thérapeutique et ne sont pas des antigènes spécifiques du CCT.*

4 Expression de la protéine p53

Bien que les études soient controversées au sujet d'une surexpression de la protéine p53 dans le CCT canin, il est intéressant d'envisager son étude comme cible possible d'immunothérapie. En effet on sait que chez l'homme, la protéine p53 est surexprimée dans les CCT et a souvent déjà été considérée comme un antigène tumoral (Ferrière *et al.*, 2001).

Bien que les résultats obtenus par Gamblin *et al.* (1997) indiquent une absence de surexpression de p53 dans les CCT canins, les auteurs précisent qu'il est possible qu'ils aient obtenus de faux négatifs pour plusieurs raisons :

- 1) La protéine synthétisée pourrait ne pas être assez stabilisée pour être détectable immunohistochimiquement,
- 2) La protéine pourrait être non reconnue par les anti-corps anti p53 humaine utilisés,
- 3) Nécessité d'utiliser plusieurs anticorps anti p53.

Enfin, des résultats contradictoires ont été obtenus par Knapp et Lin (donnée non publiée, citée dans Knapp *et al.*, 2000) et un petit nombre d'échantillons de carcinomes transitionnels examinés dans leur laboratoire ont présenté une immunoréactivité marquée aux AC-anti p53. Et une lignée de cellules de carcinome transitionnel canin a présenté également une immunoréactivité pour les AC p53 en Western Blot (Knapp, Coffman, donnée non publiée, citée dans Knapp *et al.*, 2000).

Des études immunohistochimiques complémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer une accumulation de p53 dans les cellules tumorales du CCT canin, et ainsi savoir si le chien peut être utilisé pour des essais de vaccination ciblant des peptides de p53.

→ *Il n'y a que très peu d'antigènes tumoraux identifiés chez le chien, comparé à ce qui a été fait chez l'homme. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les antigènes des cancers vésicaux de l'homme qui ont fait l'objet d'études de vaccination sont les protéines de MAGE-3 et NY-ESO-1. Il serait donc nécessaire d'étudier l'expression des antigènes testiculaires du cancer pour effectuer ensuite des essais de vaccination susceptibles de fonctionner aussi chez l'homme. La protéine p53 pourrait aussi constituer une cible intéressante à condition que sa surexpression par le CCT canin soit clairement démontrée.*

IV. ETUDES DE VACCINATION ANTITUMORALE DEJA REALISEES CHEZ LE CHIEN

Celles-ci sont très peu nombreuses, notamment parce qu'en médecine vétérinaire, des motifs économiques et pratiques s'opposent à l'exercice d'une thérapie individuelle. Ainsi les vaccins autologues, qui mobilisent un laboratoire afin de créer un vaccin à partir des cellules tumorales d'un patient, ont été abandonnés en oncologie animale. Un traitement destiné aux animaux doit pouvoir s'appliquer à un ensemble de malades.

Les seuls essais de vaccination antitumorale décrits chez le chien dans la littérature concernent le lymphosarcome canin.

En médecine vétérinaire, l'immunothérapie n'est pas utilisée seule pour traiter le lymphosarcome, mais en association avec la chimiothérapie. Deux études sont rapportées : une étude de chimio-immunothérapie effectuée par Theilen *et al.* en 1977, et une étude de Weller *et al.* en 1980. Le traitement commence par une polychimiothérapie, et les animaux qui atteignent une rémission complète sont désignés pour suivre le protocole d'immunothérapie.

Les essais de Theilen et Weller s'accordent à reconnaître que l'immunothérapie améliore les temps de rémission et de survie des patients dont le lymphosarcome a régressé suite à la chimiothérapie. La chimiothérapie réduit le nombre de cellules tumorales tandis que l'immunothérapie détruit les cellules restantes et retarde les récurrences. Les chiens présentant des signes cliniques au moment du diagnostic semblent moins réceptifs au traitement d'immunothérapie.

Cependant, Weller *et al.* ont constitué pour leur étude, trois groupes visant à comparer l'efficacité des associations cellules tumorales modifiées et Adjuvant Complet de Freund (ACF), cellules tumorales non modifiées et ACF, et ACF seul. Les résultats n'ont montré aucune différence significative dans les temps de survie et de rémission ce qui amène à remettre en cause la fabrication d'un vaccin autologue, en raison d'une efficacité comparable de l'ACF seul.

V. APPLICATION PRATIQUE

Nous allons à présent étudier les moyens d'appliquer des essais de vaccination antitumoraux sur des CCT canins à l'ENVA. Tout d'abord il faut savoir que le service d'urologie rencontre en moyenne 10 à 15 cas de CCT par an.

1 Sélection des candidats

Pour pouvoir faire des études comparables entre l'homme et le chien, il est nécessaire de détecter plus précocement les cancers de la vessie chez le chien. En effet, chez le chien, au moment du diagnostic, la tumeur est parfois déjà métastasée.

1.1 Qui dépister ?

Pour pouvoir effectuer un diagnostic le plus précoce possible, il est nécessaire de tester tous les chiens qui présenteraient des signes évocateurs de tumeurs vésicales, c'est-à-dire les animaux amenés pour cystite, présentant hématurie, strangurie, dysurie, pollakiurie ; ces signes pouvant parfois être associés à une léthargie et une perte de poids (Knapp *et al.*, 2000).

Ces symptômes étant peu spécifiques, c'est surtout chez un chien âgé qu'il faut inciter les propriétaires à accepter d'entreprendre des examens complémentaires poussés. En effet d'après l'étude de Knapp (2000) l'âge moyen au moment de la consultation est de 11 ans.

1.2 Avec quels outils pourrait-on dépister ? Et poser un diagnostic ?

Le test de dépistage idéal devrait être non invasif, peu coûteux, et présentant une sensibilité, spécificité et une précision élevées. Le *tableau 5 page 103* propose un exemple de démarche diagnostique.

1.2.1 Suspicion : Analyse urinaire :

L'**analyse d'urine** est souvent le 1^{er} test mis en œuvre lors de suspicion de tumeur vésicale. Mais les résultats de ces analyses peuvent être confondus avec ceux que l'on trouve en cas de cystite c'est-à-dire : des leucocytes, des hématies, et des bactéries. Bien que l'analyse du sédiment urinaire permette de révéler la présence de cellules tumorales réactives dans 30% des cas, il faut noter que les cellules transitionnelles non néoplasiques (cellules dysplasiques d'origine inflammatoire) peuvent paraître similaires aux cellules d'un CCT (Norris *et al.*, 1992). C'est pourquoi il faut toujours confirmer ou compléter cette analyse par d'autres examens complémentaires.

Il existe un **test vétérinaire** de dépistage rapide et disponible, pour détecter les carcinomes transitionnels du bas appareil urinaire du chien : le **V-BTA** : version vétérinaire du « Bladder Tumor Antigen », qui est une bandelette réactive qui permet une détection qualitative de composants tumoraux dans les urines. Ce test utilise des AC dirigés contre des glycoprotéines de haut poids moléculaire qui sembleraient être des complexes protéiques de la membrane basale. Les tumeurs invasives de la vessie ont la capacité de dégrader la membrane basale en fragments, le test permet donc de détecter dans les urines les complexes protéiques issus de cette destruction des membranes basales. Ce test ne nécessite que 0,5 mL d'urines centrifugées.

Chez l'homme, il a été démontré que ce test était un outil de diagnostic simple, rapide, non invasif et plus efficace que l'examen cytologique des échantillons de lavage vésical pour diagnostiquer les cancers de la vessie. Il est utilisé pour détecter les récurrences de carcinomes transitionnels (Billet *et al.*, 2002).

Une étude de cohortes a été réalisée en 2003 pour évaluer ce test comme test de dépistage des CCT du chien. L'étude portait sur 229 chiens de particuliers, et différents groupes de chiens ont été définis : des chiens avec CCT du bas appareil urinaire, des chiens témoins en bonne santé, des chiens malades avec affections du bas appareil urinaire autre qu'un CCT, et enfin, des chiens malades sans affections du bas appareil urinaire. Le résultat est que ce test est très sensible pour les carcinomes transitionnels (84,4% d'après Henry *et al.*, 2003b), mais peu spécifique.

Le problème de ce test est donc que même si la sensibilité obtenue lors de cette étude est élevée pour les CCT de la vessie, il existe de nombreux faux positifs pour les chiens présentant une protéinurie, et/ou une hématurie modérée à sévère. Lorsque l'on obtient un résultat positif, il n'y a que 3% de chance pour que le chien ait un CCT. La spécificité est donc très mauvaise pour les chiens atteints d'une affection de l'appareil urinaire autre qu'un carcinome transitionnel (41%). La centrifugation des urines augmente la performance du test mais ne règle pas le problème de la spécificité. Deux autres études portant sur le sujet obtiennent des résultats similaires (Billet *et al.*, 2002).

Ce test ne peut donc pas être utilisé comme outil pour confirmer un diagnostic, mais son utilisation peut s'envisager sur les chiens à hauts risques (âgés, race prédisposée) : si le test est positif, le chien a 20 % de risque d'être atteint, par contre s'il est négatif, il est quasiment sûr que le chien n'a pas de CCT (94%). On peut donc envisager que ce test, simple, et peu cher, pourrait permettre de pré-sélectionner les chiens chez qui une investigation supplémentaire est nécessaire : chiens âgés, de race prédisposée, avec signes d'affection du bas appareil urinaire (Henry *et al.*, 2003b).

1.2.2 Visualiser la masse :

La première étape de diagnostic consiste à réaliser un **examen échographique** ou à effectuer une **radiographie à double contraste**. En effet il faut en premier lieu mettre en évidence la présence d'une masse.

La radiographie avec produit de contraste et l'échographie sont des outils très utiles pour détecter les tumeurs vésicales, mais le risque est de considérer à tort une masse bénigne comme étant cancéreuse, d'où la nécessité d'investigations plus poussées. La radiographie avec produit de contraste permet de détecter 96% des masses (Norris *et al.*, 2003). D'après Mautsaers (2003), l'échographie serait plus efficace dans la détection de masses vésicales.

La cystographie avec produit de contraste doit être préférée pour l'évaluation de lésions urétrales, et associée à une palpation transrectale méticuleuse.

L'endoscopie est un autre moyen utilisable pour visualiser une masse vésicale, et c'est la meilleure technique pour la visualisation d'un envahissement urétral. Un autre avantage qu'elle procure est la possibilité d'effectuer dans le même temps une biopsie de la masse. Mais ce type de matériel est rarement disponible et cet examen nécessite une anesthésie générale de l'animal.

Enfin le scanner est une technique d'imagerie permettant aussi la visualisation de masses vésicales et urétrales. Sa principale limite est son coût très élevé.

1.2.3 Diagnostic de certitude : analyse histologique → description des différentes techniques :

Le diagnostic de certitude repose en effet sur une analyse histologique, obtenu par cystoscopie, biopsie par cathétérisme, ou par cystotomie (lors de l'exérèse).

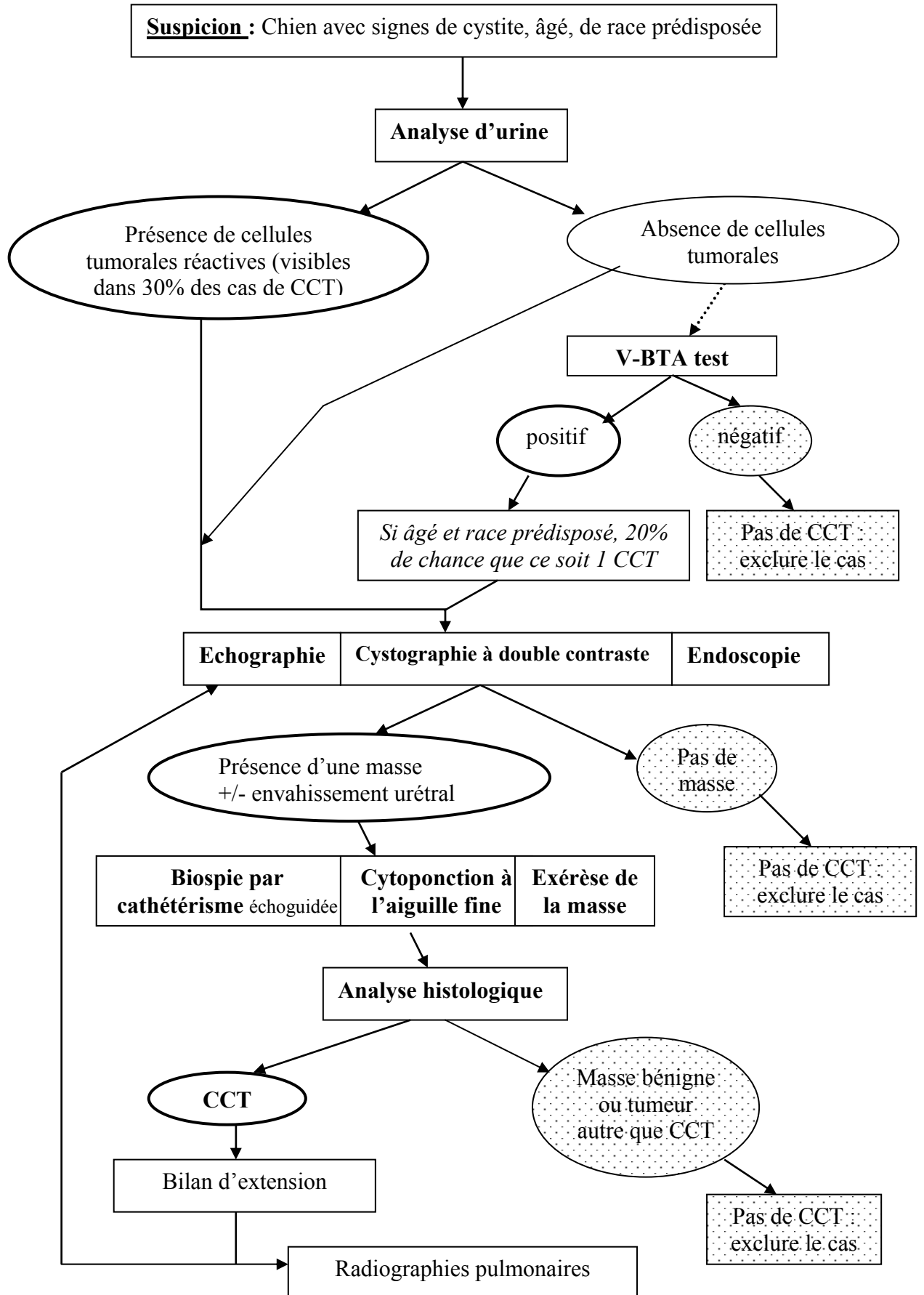
La **cytoponction à l'aiguille fine (échoguidée)** est une technique simple et très tentante pour établir un diagnostic de CCT en présence d'une masse vésicale. Cependant cette technique porte à controverse : d'après certains auteurs la cytoponction serait contre-indiquée lors de CCT car il y a un risque de dissémination tumorale le long du trajet de l'aiguille. Ainsi Nyland *et al.* (2002) décrivent trois cas de dissémination tumorale apparus au site de la cytoponction, lors de carcinome transitionnel de la vessie, de l'urètre et de la prostate. Le risque étant non négligeable, il est recommandé d'effectuer le diagnostic cytologique par cathétérisme urétral lorsque cela est possible, ou d'éviter la cytoponction si la masse est résécable chirurgicalement. Cependant, il est tout de même précisé que cette complication est si rare qu'elle ne doit pas inciter le clinicien à éviter cette technique si le cathétérisme n'est pas possible. En effet le risque est de 0,009% chez l'homme lors de cytoponction, et seuls deux cas de CCT ayant disséminé ont été décrits chez le chien. Le risque chez le chien n'est pas connu mais est sûrement sous estimé (suivi aléatoire des patients, euthanasies avant apparition de métastases...). Mais la simplicité de mise en œuvre, et les données que peut apporter une cytoponction valorisent cet acte peu coûteux et rapide. Il est par ailleurs noté qu'utiliser une aiguille de faible diamètre (21-gauge ou moins) réduirait le risque (Nyland *et al.*, 2002).

Pour éviter complètement ce risque il est possible d'effectuer une **biopsie par cathétérisme urétral**. Il suffit de placer l'orifice de la sonde urinaire contre la lésion, et de pratiquer une succion à l'aide d'une seringue de façon à aspirer un morceau de la lésion dans le cathéter. La difficulté réside dans le placement correct de l'orifice contre la lésion, pour éviter de ne récupérer que de l'urine. Lamb *et al.* (1996) ont testé une technique de biopsie par cathétérisme échoguidée sur douze chiens. L'échographie facilite le placement de la sonde (en fait il est plus simple d'amener la lésion contre la sonde que l'inverse) et permet ensuite de s'assurer de l'absence d'hémorragies consécutives au prélèvement. Le diagnostic a été obtenu dans 11 cas sur 12, mais six prélèvements ont été décrits comme étant de petite taille ou superficiels. Les avantages de cette technique, par rapport à la biopsie

échoguidée à l'aiguille fine, sont qu'elle est sans douleur, et utilisable sans sédation. D'autre part il y a beaucoup moins de risque de perforation de la paroi vésicale ou d'hémorragie intrapéritonéale, et les éventuelles hémorragies peuvent être monitorées par une analyse d'urine. Enfin il n'y a là pas de risque de dissémination tumorale comme ce que l'on peut retrouver le long du trajet de l'aiguille ou dans le champ opératoire. L'inconvénient majeur est la taille de l'échantillon obtenu qui peut limiter la précision du diagnostic histologique, et l'impossibilité d'obtenir du tissu sous-muqueux ou de biopser des lésions extraluminales (par exemple des nœuds lymphatiques hypertrophiés) (Lamb *et al.*, 1996).

Enfin il faut effectuer un **bilan d'extension** afin de définir le stade TNM de la tumeur. Pour cela il est recommandé d'effectuer trois radiographies thoraciques afin de détecter d'éventuelles métastases pulmonaires. Divers aspects radiographiques ont été rapportés lors de métastases pulmonaires de CCT et incluent une opacité interstitielle nodulaire, une opacité interstitielle diffuse non structurée (parfois confondue avec une opacité simplement liée à l'âge), des lésions pulmonaires cavitaires (aspects dus à la nécrose du centre des lésions), des infiltrats alvéolaires ou interstitiels, de multiples nodules, et une opacité pulmonaire normale. Une lymphadénopathie hilare peut aussi parfois être notée. (Henry *et al.*, 2003a) L'échographie permet de visualiser une éventuelle atteinte des nœuds lymphatiques locorégionaux.

Figure 5 : Proposition de démarche diagnostique en cas de suspicion de CCT.



1.3 Choix des candidats

Une fois la suspicion de CCT confirmée, les candidats potentiels seront bien sur choisis en fonction de l'expression par leurs cellules tumorales, de l'antigène choisi.

2 Exérèse chirurgicale de la masse

Il faudra en premier lieu effectuer une exérèse complète, ce qui est rarement possible, partielle dans le cas contraire.

Des prélèvements chirurgicaux seront mis en culture pour créer des lignées canines de carcinome vésical. Elles seront utiles pour la mise au point et le testage *in vitro* de thérapies nouvelles. Des implantations chez la souris nude seront également possibles et seront utiles en première approche dans les essais thérapeutiques

3 Préparation des vaccins canins à base de cellules dendritiques

3.1 Choix de l'antigène

Comme nous l'avons vu précédemment il serait utile d'étudier l'expression des antigènes testiculaires du cancer par le CCT canin, ainsi que l'expression de p53. Ainsi il sera possible de choisir l'antigène le plus approprié parmi ceux ci et cela permettra de faire des essais applicables chez l'homme.

3.2 Obtention de cellules dendritiques canines à partir des cellules mononucléées du sang périphérique

Une fois les cas sélectionnés, l'objectif est de réaliser des essais de vaccination antitumorale à partir de cellules dendritiques. Il est possible d'isoler des CD^s à partir de sang périphérique, mais comme la quantité de CD^s présentes dans le sang est faible, leur utilité en clinique est limitée.

Chez l'homme il est devenu possible de produire un nombre suffisant de CD^s pour la production de vaccins à base de CD, celles-ci étant issues de la moelle osseuse ou de précurseurs sanguins *in vitro*. Ceci est possible en cultivant soit des cellules CD34⁺ ou des PBMC avec du GM-CSF, du TNF- α , ou de l'IL-4. La maturation peut être induite par stimulation avec du TNF- α , des lipopolysaccharides, ou CD40L (Yoshida *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont démontré qu'il était possible d'isoler directement les cellules dendritiques canines à partir du sang ou des nœuds lymphatiques, par des méthodes de centrifugation gradient densité.

Yoshida *et al.* (2003) ont réussi à générer un nombre suffisant de CD à partir de PBMC. Ils ont cultivé ces PBMC en présence de phytohémagglutinine (lectine extraite des graines de haricots, et douée de la capacité d'agglutiner les hématies et les leucocytes et d'induire la transformation lymphoblastique des lymphocytes). En 10 jours ils ont pu obtenir 2 à 5 x 10⁶ CD à partir de 10mL de sang chez les six chiens testés. Ils ont également démontré la capacité de phagocytose de ces CD^s, en les mettant en contact avec une lignée de cellules tumorales pendant 24h. Cela prouve ainsi une utilisation possible pour des essais cliniques d'immunothérapie à partir de cellules dendritiques et de cellules entières, chez le chien (Yoshida *et al.*, 2003).

Il existe d'autres méthodes mais qui sont plus contraignantes car elles nécessitent un prélèvement de moelle osseuse et donc une anesthésie générale. D'après Yoshida *et al.* (2003), Hagglund et al. ont rapporté dans leur étude que des cellules CD34⁺ canines isolées à partir de moelle osseuse, sont capables de se différencier en CD⁺ *in vitro* par contact avec du GM-CSF humain.

3.3 Les différentes méthodes utilisables pour charger les cellules dendritiques avec les antigènes tumoraux

Il existe différentes méthodes pour charger les antigènes sur les cellules dendritiques.

On sait que les CD pulsées avec des peptides bien définis ou des protéines associées aux tumeurs ont permis d'induire une immunité antitumorale chez l'homme et l'animal. Bien que cette approche permette de se passer de tissu tumoral, elle nécessite que les antigènes tumoraux aient été identifiés. Or peu d'antigènes tumoraux ont à ce jour été identifiés chez le chien, comme nous avons pu le constater précédemment. D'autre part le grand polymorphisme des molécules du CMH restreint également le nombre de candidats sélectionnables pour cette thérapie.

Une autre technique consiste à mettre en contact les CD avec un lysat de cellules entières, de l'ARN tumoral complet, ou des cellules tumorales. Ces CD ainsi chargées pourraient potentiellement stimuler l'immunité contre certains antigènes tumoraux. Une immunisation avec cette méthode ne serait pas limitée aux individus exprimant un allèle particulier de CMH, et ne nécessiterait pas d'avoir identifié des antigènes tumoraux. Yoshida *et al.* (2003) ont par ailleurs démontré qu'une co-culture de CD avec des cellules tumorales entières était un moyen simple de charger des antigènes tumoraux (Yoshida *et al.*, 2003).

Il a été démontré que la maturation des CD engendrerait une plus forte immunité anti-tumorale. Il reste donc à identifier les méthodes pour induire la maturation des CD chez le chien, ainsi que les adjuvants à administrer avec le vaccin pour augmenter l'immunité anti-tumorale chez les patients cancéreux qui présentent généralement une immunosuppression.

4 Protocole de vaccination

Le protocole de vaccination reste encore à être défini.

5 Méthode d'évaluation de la réponse au traitement

L'échographie semble être un bon outil pour suivre la réponse au traitement. Il est cependant important, pour que le suivi soit correct, d'utiliser la même technique d'imagerie à chaque visite de contrôle.

L'**échographie** est, d'après Mutsaers (2003), supérieure à la radiographie avec produit de contraste. Les seules exceptions sont la présence de masses minéralisées qui dispersent ou atténuent les ultrasons ce qui donne une image de mauvaise qualité, et les lésions assez caudales dans le canal pelvien (lésions urétrales) pour lesquelles une bonne fenêtre d'observation ne peut pas être obtenue. L'échographie présente aussi l'intérêt d'évaluer l'envahissement tumoral des nœuds lymphatiques et des organes abdominaux.

L'avantage de la **cystographie avec produit de contraste** est la disponibilité et le coût de l'équipement, et la meilleure reproductibilité de la technique lorsqu'elle est effectuée par des personnes différentes.

Dans les deux cas la vessie doit être correctement distendue pour pouvoir évaluer précisément la localisation et la taille de la masse.

VI. SYNTHESE

Le CCT spontané canin est un modèle utilisable pour des essais de vaccination antitumorale dans les conditions suivantes :

- **Il faudrait que des études supplémentaires soient entreprises pour évaluer l'expression des antigènes tumoraux connus chez l'homme, notamment les antigènes testiculaires du cancer (MAGE-3, NY-ESO-1), qui ont un bon potentiel pour servir de cible vaccinale.**
- **Il serait aussi intéressant d'établir le niveau d'expression de la protéine p53 dans le CCT canin, pour voir si p53 pourrait servir aussi de cible vaccinale.**

En plus de servir comme modèle pour l'homme, tester ces méthodes chez le chien permettrait de développer de nouvelles techniques en médecine vétérinaire, chez laquelle l'emploi de l'immunothérapie est encore très restreint. En effet chez le chien, les tumeurs vésicales représentent toujours une difficulté thérapeutique. Dans cette étude, de nombreux traitements utilisés chez l'homme en immunothérapie, autres que la vaccination, ont été développés et on pourrait envisager qu'ils puissent être testés chez le chien.

CONCLUSION

Les limites des traitements actuels des cancers de la vessie rendent nécessaire l'établissement de nouvelles thérapeutiques plus efficaces. Nous nous sommes ici intéressés à l'immunothérapie, et plus particulièrement à la vaccination anti-tumorale. Les essais déjà entrepris n'ont donné que des résultats mitigés. Il est donc nécessaire d'explorer cette nouvelle stratégie thérapeutique sur un modèle animal approprié.

Nous avons démontré dans cette étude la grande similarité des cancers invasifs de l'homme avec le carcinome à cellules transitionnelles spontané du chien, ce qui en fait un modèle idéal pour tester tous ces nouveaux traitements.

Cependant pour que des essais vaccinaux reproductibles chez l'homme puissent être entrepris, il reste à mettre en évidence des antigènes de rejet tumoral communs entre l'homme et le chien. Si ces antigènes ont été très étudiés chez l'homme, ce n'est pas encore le cas chez le chien. Et les essais déjà entrepris chez l'homme concernant les antigènes testiculaires du cancer, notamment MAGE-3 et NY-ESO-1, il serait intéressant d'étudier leur expression par les tumeurs vésicales du chien. La protéine p53 pourrait aussi constituer une cible intéressante pour la vaccination, cependant de nouvelles études sont nécessaires pour infirmer ou confirmer une surexpression de p53 dans les CCT canins.

Une fois le bon antigène trouvé, des essais pourront être entrepris. En effet, dix à quinze cas de CCT sont rencontrés chaque année à l'ENVA, et l'on sait déjà extraire et multiplier les cellules dendritiques canines et leur faire exprimer un antigène donné. Un protocole vaccinal optimal reste encore à être défini. Enfin, l'idéal serait de pouvoir effectuer des essais sur un nombre suffisant de chiens afin de pouvoir comparer les résultats aux réponses obtenues avec les traitements actuels.

ANNEXES

Liste des Annexes :

Annexe 1 : Classification consensus de la World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) des lésions (des cellules transitionnelles) urothéliales..... p111

Annexe 2 : Liste des antigènes tumoraux des cancers de la vessie, reconnus par les cellules T..... p113-115

ANNEXE 1 : Classification consensus de la World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) des lésions (des cellules transitionnelles) urothéliales. (Kirkali *et al.*, 2005)

Classification WHO/ISUP	Description des lésions (références issues de Kirkali <i>et al.</i> , 2005)
<ul style="list-style-type: none"> • Normal ○ Normal (<i>pouvant inclure les cas auparavant diagnostiqués comme des dysplasies modérées</i>) 	<p>La classification consensus a établi que le terme “dysplasie modérée” ne devait pas être utilisé, et que les lésions plates avec des atypies cellulaires et des anomalies architecturales minimales devraient être désignées comme normales.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Hyperplasie ○ Hyperplasie plane (1) ○ Hyperplasie papillaire (2) 	<p>(1) Correspond à un épaississement marqué de la muqueuse sans atypie cellulaire, et qui peut être observée à proximité de néoplasmes papillaires de bas grade. Mais observés de façon isolée, il n’y a aucune donnée sur un éventuel potentiel de pré-malignité.</p> <p>(2) Caractérisée par un urothélium d’épaisseur variable, de croissance irrégulière. Contrairement aux tumeurs urothéliales papillaires, ces lésions sont dépourvues de coeurs fibrovasculaires distincts. Cette lésion serait une lésion précurseur de néoplasme papillaire (Taylor <i>et al.</i>, 1996). Les lésions d’hyperplasie papillaire peuvent être tapissées d’un urothélium de cytologie atypique allant de la dysplasie à un CIS plat, qui sont souvent associés avec ce genre de lésion, et sont suspectés d’être des précurseurs de carcinome urothélial papillaire de haut grade (Swierczinski et Epstein, 2002)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Lésions planes avec atypie ○ Atypie réactive (inflammatoire) (1) ○ Dysplasie (2) ○ Carcinome in situ (CIS) (3) (<i>pouvant inclure les cas auparavant diagnostiqués comme des dysplasies sévères</i>) 	<p>(1) Atypie inflammatoire qui ne doit pas être considérée comme pré-néoplasique.</p> <p>(2) Lésion avec anomalies architecturales et cytologiques appréciables, suspectée comme étant de nature néoplasique, et pourtant proche du seuil de diagnostic du CIS. Il existe des preuves selon lesquelles la dysplasie serait un précurseur de carcinome invasif. (Hofstader <i>et al.</i>, 1986, Heney et al. 1983)</p> <p>(3) lésion plane de l’urothélium et définie comme précurseur de cancer invasif dans de nombreux cas. D’après la classification WHO/ISUPCIS, les CIS sont toujours considérés, par définition, comme des lésions de haut grade.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Néoplasme papillaire : ○ Papillome (1) ○ PUNLMP: (<i>papillary urothelial neoplasms of low malignant potential</i>) néoplasme urothélial papillaire à faible potentiel de malignité (2) ○ Carcinome papillaire, de bas grade (3) ○ Carcinome papillaire, de haut grade (4) 	<p>(1) Un urothélium d’apparence normale tapisse une couche papillaire. Ainsi c’est une situation bénigne rare, qui apparaît comme une croissance petite et isolée observée essentiellement chez les patients plus jeunes. Une fois excisées, la plupart des lésions ne récidivent pas. (Mc Kenney <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(2) Lésion n’ayant pas d’aspects cytologiques de malignité, mais ayant un urothélium de taille épaissie comparée au papillome. Lésion ayant un très faible risque de progression mais n’étant pas totalement bénigne.</p> <p>(3) Lésion présentant une apparence globalement ordonnée, mais contenant une variabilité minimale dans son architecture ou/et dans ses aspects cytologiques, facilement reconnaissable au microscope à balayage.</p> <p>(4) Lésion caractérisée par une apparence désordonnée, liée à la présence d’anomalies architecturales ou cytologiques marquées, visible à un faible grossissement.</p>

ANNEXE 2 (page 1/3) : Liste des antigènes tumoraux des cancers de la vessie, reconnus par les cellules T.

Source : Novellino *et al.*, 2004 (Liste mise à jour en mars 2004)

En gras et italique : Informations complémentaires ajoutées au tableau d'origine.

Partie 1: Antigènes des cancers des testicules, restreints aux HLA de classe I, exprimés par les cancers de la vessie. Ces antigènes sont exprimés par la lignée germinale mâle. Occasionnellement, il a été constaté que MAGE-3, MAGE-4 et les gènes GAGE étaient aussi exprimés par le placenta. NY-ESO-1 est aussi exprimé par les cellules ovariennes normales.			
Gène	HLA	Peptide épitope	Sources (issues de Novellino et al. 2004)
BAGE	Cw16	AARAVFLAL	Boël <i>et al.</i> , 1995
CAMEL carcinomes infiltrants	A2	MLMAQEALAFI	Aarnoudse <i>et al.</i> , 1999
GAGE-1, -2, -8 carcinomes infiltrants	Cw6	YRPRPRRY	Van den Eynde <i>et al.</i> , 1995 et De Backer <i>et al.</i> , 1999
MAGE-A1	A1 A3 A24 A28 B37 B53 Cw2 Cw3 Cw16	EADPTGHSY SLFRAVITK NYKHCPEI EVDYDGREHSA REPVTKAEML DPARYEFLW SAFPTTINF SAYGEPKRL ^c SAYGEPKRL ^c	Traversari <i>et al.</i> , 1992 Chaux <i>et al.</i> , 1999 Fujie <i>et al.</i> , 1999 Chaux <i>et al.</i> , 1999 Tanzarella <i>et al.</i> , 1999 Chaux <i>et al.</i> , 1999 Chaux <i>et al.</i> , 1999 Chaux <i>et al.</i> , 1999 Van der Bruggen <i>et al.</i> , 1994
MAGE-A2	A2 A2 A24 B37	KMVELVHFL YLQLVFGIEV EYLQLVFGI REPVTKAEML	Visseren <i>et al.</i> , 1997 Visseren <i>et al.</i> , 1997 Tahara <i>et al.</i> , 1999 Tanzarella <i>et al.</i> , 1999
MAGE-A3	A1 A2 A24 A24 B44 B52 B37 B*3501	EADPIGHLV FLWGPRALV TFPDLESEF IMPKAGLLI MEVDPIGHLV WQYFFPVIF REPVTKAEML EVDPIGHLV	Gaugler <i>et al.</i> , 1994 van der Bruggen <i>et al.</i> , 1994 Oiso <i>et al.</i> , 1999 Tanaka <i>et al.</i> , 1997 Herman <i>et al.</i> , 1996 et Fleischhauer <i>et al.</i> , 1996 Russo <i>et al.</i> , 2000 Tanzarella <i>et al.</i> , 1999 Benlalam <i>et al.</i> , 2003
MAGE-A4	<i>A1</i> <i>A24</i> A2 <i>B37</i>	<i>EVDPASNTY</i> <i>NYKRCFPVI</i> GVYDGREHTV <i>SESLKMIF</i>	<i>Kobayashi et al. 2003</i> <i>Ottaviani et al. 2006</i> Duffour <i>et al.</i> , 1999 <i>Zhang et al. 2002</i>
MAGE-A6	A34 B37 B*3501	MVKISGGPR REPVTKAEML EVDPIGHVY	Zorn and Hercend 1999 Tanzarella <i>et al.</i> , 1999 Benlalam <i>et al.</i> , 2003
<i>MAGE-A8</i>	<i>A2.1</i>	<i>2 peptides identifiés</i>	<i>Bar Haim et al. 2004</i>
MAGE-A10	A2	GLYDGMEHL	Huang <i>et al.</i> , 1999
MAGE-A12	Cw7	VRIGHLYIL	Panelli <i>et al.</i> , et Heidecker <i>et al.</i> , 2000
NY-ESO-1	A2 A2 A2 B*3501	SLLMWITQCFL SLLMWITQC QLSLLMWIT MPFATPMEA	Jäger <i>et al.</i> , 1998 Jäger <i>et al.</i> , 1998 Jäger <i>et al.</i> , 1998 Benlalam <i>et al.</i> , 2003

ANNEXE 2 (page 2/3)

Partie 2 : Antigènes associés aux cancers de la vessie, surexprimés, et largement répandus, restreints au HLA de classe I.				
Gène	HL A	Peptide épitope	Sources (issues de Novellino et al. 2004)	Distribution tissulaire (au sein des tissus normaux)
AFP (détectable)	A2	GVALQTMKQ	Butterfield <i>et al.</i> , 1999	Synthétisé par le foie du fœtus et le sac vitellin. Faibles niveaux dans le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, la prostate, l'estomac, le pancréas, les glandes surrénales, les glandes salivaires, le foie, l'intestin grêle et le sang périphérique, chez l'adulte.
Cyp-B	A24	KFHRVIKDF DFMIQGGDF	Gomi <i>et al.</i> , 1999 Gomi <i>et al.</i> , 1999	Exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus normaux.
Livin (ML-IAP) (niveau d'expression moyen)	A2	SLGSPVLGL RLASFYDWPL	Schmollinger <i>et al.</i> , 2003	Deux isoformes. Exprimé pendant le développement foetal normal. Détecté dans le cœur, les testicules, les ovaires, le thymus, la rate, les noeuds lymphatiques, les PBLs, et moelle osseuse, chez l'adulte. Faibles niveaux dans la prostate, l'intestin grêle, le colon, le cerveau, le placenta, le foie, les muscles squelettiques, les reins, et le pancréas. Non détectable dans les autres tissus adultes, incluant les mélanocytes. Une distribution tissulaire différente est donnée par d'autres auteurs par une méthode d'analyse par RT-PCR : rein, cœurs et rate fœtaux. Dans les tissus adultes: hauts niveaux dans le cœur, le placenta, les poumons, la rate, et les ovaires. Faible niveau dans le cerveau, les muscles squelettiques, les reins, et les PBLs.
P53	A24 B46	AIYKQSQHM SQKTYQGSY	Umano <i>et al.</i> Azuma K <i>et al.</i> ,	Surexpression décrite par plusieurs auteurs (Vardar et al. 2006, Mhaweche-Fauceglia et al. 2006) Exprimé de façon ubiquitaire mais à un faible niveau.
RAGE	B7	SPSSNRIRNT	Gaugler <i>et al.</i> , 1996	Seulement la rétine
RU1	B51	VPYGSFKHV	Morel <i>et al.</i> , 2000	Testicules, rein, cœur, peau, cerveau, ovaires, foie, poumons, lymphocytes, thymus, fibroblastes
RU2	B7	LPRWPPPQL	Van den Eynde <i>et al.</i> , 1999	Testicules, reins, foie, et vessie
Survivin	A2 A2	ELTLGEFLKL TLPPAWQPFL	Andersen <i>et al.</i> , 2000, Schmitz <i>et al.</i> , 2000, Andersen <i>et al.</i> , 2001, Casati <i>et al.</i> , 2003, Schmidt <i>et al.</i> , 2003 Schmitz <i>et al.</i> , 2000	Exprimés pendant le développement foetal normal. Forte expression dans les testicules, le thymus, et le placenta. Faible expression dans l'estomac, les intestins, la rate, les poumons, les reins, la prostate, le pancréas, et le cœur. Transitoirement exprimé dans les cellules prolifératives normales pendant la phase G2/M.
Survivin-2Bg	A24	AYACNTSTL	Hirohashi <i>et al.</i> , 2002	Thymus

ANNEXE 2 (page 3/3)

Partie 3: Antigènes spécifiques des cancers de la vessie, restreints au HLA de classe I.			
Gène	HLA	Peptide épitope	Sources (issues de Novellino et al. 2004)
KIAA0205	B44*03	AEPINIQTV	Gueguen <i>et al.</i> , 1998

Remarque : il n'y a pas d'antigènes de différenciation décrits pour les cancers de la vessie

BIBLIOGRAPHIE

(99 références)

ADAM J.K., ODHAV B., BHOOLA K.D. (2003) Immune responses in cancer. *Pharmacol. Ther.* **99**, 113-132.

ALLEN K.D, WATERS D.J, KNAPP D.W, KUCZEK T. (1996) High Urine Concentrations of Basic Fibroblast Growth Factor in Dogs With Bladder Cancer. *J. Vet. Int. Med.*, **10**, 231-234.

BAR-HAIM E., PAZ A., MACHLENKIN A., HAZZAN D., TIROSH B., CARMON L. *et al.* (2004) MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumor-associated antigen peptides. *Br. J. Cancer*, **91**, 398-407.

BASSILY N.H., VALLOROSI C.J., AKDAS G., MONTIE J.E., RUBIN M.A. (2000) Coordinate expression of cytokeratins 7 and 20 in prostate adenocarcinoma and bladder urothelial carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, **113**, 383-388.

BERNARD J., KOCHMAN S. (1997) Cellules dendritiques et réponse immune de rejet tumoral. *Rev. Fr. Allergol.*, **37**, 271-277.

BILLEREY C., SIBONY M. (2001a) Chapitre I : Anatomie pathologique des tumeurs superficielles de la vessie. C. Grading des tumeurs urothéliales et D. Stadification des tumeurs vésicales. *Prog. Urol.*, **11**, 815-825.

BILLEREY C., SIBONY M. (2001b) Chapitre I : Anatomie pathologique des tumeurs superficielles de la vessie. G. Pronostic et histopronostic des tumeurs urothéliales, Marqueurs tumoraux. *Prog. Urol.*, **11**, 838-846.

BILLET J.P., HOTSTON MOORE A., HOLT P.E. (2002) Evaluation of a bladder tumor antigen test for diagnosis of lower urinary tract malignancies in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **63**, 370-373.

BÖHLE A, BRANDAU S. (2003) Immune mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*, **170**, 964-969.

BOJRAB M.J., PERRY L., TAMAS S.P. (1986) Transitional Cell Carcinoma of the Canine Bladder : Diagnosis and Management. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, **8**, 495-499.

BOUCHOT O., ZERBIB M. (2002) Synthèse sur les traitements des tumeurs infiltrantes de vessie. *Prog. Urol.*, **12**, 1143-1157.

BRANDAU S., BÖHLE A. (2001) Bladder cancer : I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur. Urol.*, **39**, 491-497.

BRODEY R.S., RISER W.H., ALLEN H. (1973) Hypertrophic pulmonary osteoarthropathy in a dog with carcinoma of the urinary bladder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **162**, 474-478.

BROGHAMMER E.L., RATLIFF T.L. (2002) Immunotherapy of urologic tumors: principles and progress, *Urol. Oncol.*, **7**, 45-56.

- BRUTUS C. (1993) *Apport de la radiothérapie per-opératoire dans le traitement des tumeurs vésicales du chien*. Thèse Méd. Vét., Alfort, N°110, 78p.
- BURSHTYN D.N., SCHARENBERG A.M., WAGTMANN N. (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitory receptor. *Immunity*, **4**, 77-85.
- CHAPUT N., TAIEB J., ULLRICH E., ZITVOGEL L. (2006) Une nouvelle cellule dendritique impliquée dans l'immunité anti-tumorale. *Med. Sci.*, **22**, 567-568.
- CHOPIN D.K., GATTEGNO B. (2002) Résumé du rapport 2001 de l'Association Française d'Urologie sur les tumeurs superficielles de la vessie. *Prog. Urol.*, **12**, 1-28.
- CHUN R., KNAPP D.W., WIDMER W.R., DENICOLAS D.B., GLICKMAN N.W., KUCZEK T., *et al.* (1997) Phase II clinical trial of carboplatin in canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J. Vet. Intern. Med.*, **11**, 279-283.
- CLEMO F.A.S., DENICOLA D.B., CARLTON W.W., WALKER E., MORRISON W.B. (1995) Immunoreactivity of Canine Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder with Monoclonal Antibodies to Tumor-Associated Glycoprotein 72. *Vet. Pathol.*, **32**, 155-161.
- CORAL S., SIGALOTTI L., ALTOMONTE M., ENGELSBERG A., COLIZZI F., CATTAROSSO I. *et al.* (2002) 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma : immunotherapeutic implication. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 2690-2695.
- COSTELLO R.T., GASTAUT J.A., OLIVE D. (1999) Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immunitaire. *Rev. Méd. Interne*, **20**, 579-588.
- DANGLES V. (1998) *Contribution à l'étude de la réponse immune dirigée contre la sous-unité β de l'hormone chorionique gonadotrope humaine, potentiel antigène de rejet de tumeurs vésicales*. Thèse Méd. Vét., Alfort, N°27, 60p.
- DEMIAUX V. (2003) *Les tumeurs vésicales chez le chien*. Thèse Méd. Vét., Nantes, N°94, 163p.
- DE REIJKE T.M., DE BOER E.C., SCHAMHART D.H., KURTH K.H. (1997) Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell wall skeleton preparation (Rubratin) for superficial bladder cancer immunotherapy – a phase I/II study. *Urol. Res.*, **25**, 117-120.
- DINNEY C.P.N., (2006) Therapy of invasive bladder cancer. *Urology*. **67**, 56-61.
- ETO H., SAYA H., NAKATA M., MIZOGUCHI A., KAMINODO S. (1989) Antigen common to several species, recognized by a rat monoclonal antibody raised against syngenic rat bladder tumor. *Int. J. Cancer.*, **44**, 454-459.
- FERRIÈS E., CONNAN F., PAGÈS F., GASTON J., HAGNÉRE A-M., VIEILLEFOND A., *et al.* (2001) Identification of p53 Peptides Recognized by CD8+ T lymphocytes From Patients With Bladder Cancer. *Hum. Immunol.*, **62**, 791-798.
- FRADET Y., PICARD V., BERGERON A., LARUE H. (2005) Cancer-testis antigen expression in bladder cancer. *Prog. Urol.*, **15**, 1303-1313.
- GAMBLIN R.M., SAGARTZ J.E., GUILLERMO COUTO C. (1997) Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 857-863.

GIANNOPOULOS A., ADAMAKIS L., EVANGELOU K., GIANNOPOULOU M., ZACHARATOS P., ZSANTOULIS P., *et al.* (2003) Interferon- α 2b reduces micro-vascular density in the “normal urothelium” adjacent to the tumor after transurethral resection of superficial bladder carcinoma. *Onkologie*, **26**, 147-152.

GLICKMAN L.T., SCHOFER F.S., MCKEE M.J., REIF J.S., GOLDSCHMIDT M.H. (1989) Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **28**, 407-414.

GLICKMAN L.T., RAGHAVAN M., KNAPP D.W., BONNEY P.L., DAWSON M.H. (2004) Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **224**, 1290-1297.

GUEGUEN M., PATARD J.J., GAUGLER B., BRASSEUR F., RENAULD J.C., VAN CANGH P.J. (1998) An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol.*, **160**, 6188-6194.

HEIDECKER L., BRASSEUR F., PROBST-KEPPER M., GUEGUEN M., BOON T., VAN DEN EYNDE B.J. (2000) Cytolytic T Lymphocytes Raised Against a Human Bladder Carcinoma Recognize an Antigen Encoded by Gene MAGE-A12. *J. Immunol.*, **164**, 6041–6045.

HELFAND S.C., HAMILTON T.A., HUNGERFORD L.L., JEGLUM K.A., GOLDSCHMITT M.A. (1994) Comparison of three treatments for transitional cell carcinoma of the bladder in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **30**, 270-275.

HENRY C.J. (2003a) Management of transitional cell carcinoma. *Vet. Clin. Small. Anim.*, **33**, 597-613.

HENRY C.J., TYLER J.W., MCENTEE M.C., STOCKOL T., ROGERS K.S., CHUN R., *et al.* (2003b) Evaluation of a bladder tumor antigen test as a screening test for transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **64**, 1017-1020.

HENRY C.J., MCCAWE D.L., TURNQUIST S.E., TYLER J.W., BRAVO L., SHEAFOR S. (2003c) Clinical evaluation of Mitoxantrone and Piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 906–911.

HUBER C.H., WÖLFEL T. (2004) Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **130**, 367-374.

JÄGER E., NAGATA Y., GNJATIC S., WADA H., STOCKERT E., KARBACH J., *et al.* (2000) Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4760-4765.

JARDINE J.H., JACKSON H.J., LOTZOVA E., SAVARY C.A., SMALL S.M. (1989) Tumoricidal effect of interleukine-2-activated killer cells in canines. *Vet. Immunol.*, **21**, 153-160.

JAKÓBISIAK M., LASEK W., GOŁĄB J. (2003) Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol. Lett.*, **90**, 103–122.

- KAUFMANN O., VOLMERIG J., DIETEL M. (2000) Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*, **113**, 683-687.
- KHAN K.N.M., KNAPP D.W., DENICOLA D.B., HARRIS R.K.H. (2000) Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **61**, 478-481.
- KIRKALI Z., CHAN T., MANOHARAN M., ALGABA F., BUSCH C., CHENG L. *et al.* (2005) Bladder Cancer : Epidemiology, staging, and grading, and diagnosis. *Urol. Oncol.*, **66** (suppl 6A), 4-34.
- KNAPP D.W., GLICKMAN N.W., DENICOLA D.B., BONNEY P.L., LIN T.L.L., GLICKMAN L.T., (2000) Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol. Oncol.*, **5**, 47-49.
- KNOTTENBELT C., MELLOR D., NIXON C., THOMPSON H., ARGYLE D.J. (2006) Cohort Study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumours. *J. Small. Anim. Pract.*, **47**, 196-200.
- KOBAYASHI T., LONCHAY C., COLAU D., DEMOTTE N., BOON T., VAN DER BRUGGEN P. (2003) MAGE-4 peptide presented to CTL by HLA-A1. *Tissue Antigens*, **62**, 426-432.
- KURASHIGE T., NOGUSHI Y., SAIKA T., ONO T., NAGATA Y., JUNGBLUTH A., *et al.* (2001) NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.*, **61**, 4671-4674.
- LAMB C.R., TROWER N.D., GREGORY S.P. (1996) Ultrasound-guided catheter biopsy of the lower urinary tract: technique and results in 12 dogs. *J. Small Anim. Pract.*, **37**, 413-416.
- LOPEZ C.B., RAO T.D., FEINER H., SHAPIRO R., MARKS J.R., FREY A.B. (1998) Repression of interleukin-2 mRNA translation in primary human breast carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **190**, 141-155.
- MACY D.W., WITHROW S.J., HOOPEES J. (1983) Transitional Cell Carcinoma of the Bladder associated with Cyclophosphamide Administration. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **19**, 965-969.
- MAGNOL J.P. ACHACHE S. (1983) *Cancérologie vétérinaire et comparée, générale et appliquée*. Maloine, Paris, 255-275, 340-353.
- MARCHAND M., PUNT. C.J.A., AAMDAL S., ESCUDIER B., KRUIT W.H.J., KEILHOLZ U., *et al.* (2003) Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-A3 protein combined with adjuvant SBAS-2 : a clinical report. *Eur. J. Cancer.*, **39**, 70-77.
- McEWEN E.G., HELFAND S.C. (1996) Immunology and biologic therapy of cancer. *In: McEWEN E.G, WITHROW S.J., editors. Small Animal Clinical Oncology*. Philadelphia. 99-116.
- MHAWECH-FAUCEGLIA P., CHENEY R.T., FISCHER G., BECK A., HERRMANN F.R. (2006) FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.*, **32**, 231-237.

- MOHAMMED S.I., KNAPP D.W., BOSTWICK D.G., FOSTER R.S., KHAN K.N.M., MASFERRER J.L. et al. (1999) Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Human Invasive Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Cancer Res.*, **59**, 5647-5650.
- MOHAMMED S.I., BENNETT P.F., CRAIG B.A., GLICKMAN N.W., MUTSAERS A.J., SNYDER P.W., et al. (2002) Effects of the Cyclooxygenase Inhibitor, Piroxicam, on Tumor Response, apoptosis, and Angiogenesis in a Canine Model of Human Invasive Urinary Bladder Cancer. *Cancer Res.*, **62**, 356-358.
- MOHAMMED S.I., CRAIG B.A., MUTSAERS A.J., GLICKMAN N.W., SNYDER P.W., DEGOTARI A.E., et al. (2003) Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 183-188.
- MONNET S. (2002) *Le système immunitaire et les tumeurs spontanées chez les mammifères domestiques*. Thèse Méd. Vét., Nantes, N°93, 136p.
- MUTSAERS A.J., WIDMER W.R., KNAPP D.W. (2003) Canine Transitional Cell Carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* **17**, 136-144.
- National Cancer Institute. *Site du National Cancer Institute*. [En ligne], [<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/>], (consulté le 25 août 2006).
- NIKULA K.J., BENJAMIN S.A., ANGLETON G.M., LEE A.C. (1989) Transitional Cell Carcinomas of the Urinary Tract in a Colony of Beagles Dogs. *Vet. Pathol.*, **26**, 455-461.
- NISHIYAMA T., TACHIBANA M., HORIGUCHI Y., NOKAMURA K., IKEDA Y., TAKESAKO K. (2001) Immunotherapy of Bladder Cancer Using Autologous Dendritic Cells Pulsed with Human Lymphocyte Antigen-A24-specific MAGE-3 Peptide. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 23-31.
- NORRIS A.M., LAING E.M., VALLI V.E.O. (1992) Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980-1985). *J. Vet. Intern. Med.*, **6**, 145-153.
- NOVELLINO L., CASTELLI C., PARMIANI G. (2005) A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 187-207.
- NYLAND T.G., WALLACK S.T., WISNER E.R. (2002) Needle-tract implantation following us guided fine-needle aspiration biopsy of transitional cell carcinoma of the bladder, urethra and prostate. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, **43**, 50-53.
- OGLIVIE G.K., MOORE A.S. (1997) *Manuel pratique de cancérologie vétérinaire*. Masson, Paris, Editions du Point Vétérinaire, 539p.
- ORENTAS R.J., KOHLER M.E., JOHNSON B.D. (2006) Suppression of anti-cancer immunity by regulatory T cells: Back to the future. *Semin. Cancer Biol.*, **16**, 137-149.
- OSBORNE C.A., FINCO D.E. (1995) *Canine and Feline Urology and Nephrology*. London, Lea and Febinger, 960p.
- OSTRANDER E.A., GINIGER E. (1997) Insights from model systems. Semper fidelis: what man's best friend can teach us about human biology and disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 475-480.

- OTTAVIANI S., COLAU D., VAN DER BRUGGEN P. (2006) A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, **55**, 867-872.
- PATARD J-J., BRASSEUR F., GIL-DIEZ S., RADA VANYI F., MARCHAND M., FRANCOIS P., et al. (1995) Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int. J. Cancer*, **64**, 60-64.
- PERABO F.G, KAMP S., SCHMIDT D., LINDNER H., STEINER G. MATTES R.H. *et al.* (2001) Bladder cancer cells acquire competent mechanisms to escape Fas-mediated apoptosis and immunesurveillance in the course of malignant transformation. **Br. J. Cancer**, **84**, 1330-1338.
- PERABO F.G.E., MULLER S.C. (2004) Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urol.*, **64**, 409-421.
- PLUNKETT T.A., MILES D.W. (1999) Immunotherapy: the last 25 years. *Cancer Treatment Rev.*, **25**, 355-363.
- RAGHAVAN M., KNAPP D.W., DAWSON M.H., BONNEY P.L., GLICKMAN L.T. (2004) Topical flea ant tick pesticides and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in scottish terriers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **225**, 389-394.
- RAMOS-VARA J.A., MILLER M.A., BOUCHER M., ROUDABUSH A., JOHNSON G.C. (2003) Immunohistochemical detection of Uroplakin II, Cytokeratin 7, and Cytokeratin 20 in Canine Urothelial Tumors. *Vet. Pathol.*, **40**, 55-62.
- REMONTET L., BUEMI A., VELTEN M., JOUGLA E., ESTEVE J. (Août 2003) Vessie. In : *Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000*. [en-ligne] Paris : ACTIS, 2003, Réseau français des registres du cancer, Francim Hôpitaux de Lyon, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Inserm, Institut de veille sanitaire. [http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003/index.html] (consulté le 20 mars 2006)
- RENAUDIN K., MOREAU A., BUZELIN A. (2002a) Définition et Classification des tumeurs infiltrantes de vessie. *Prog. Urol.*, **12**, 773-779.
- RENAUDIN K., MOREAU A., BUZELIN A. (2002b) Histopronostic des tumeurs urothéliales infiltrantes. *Prog. Urol.*, **12**, 803-804.
- RICHIE J.P., BONO A., DENIS L.J., JEWETT M.A.S., KAZIKOE T, KOTAKE T, *et al.* (1998) Tumor, nodes, metastasis (TNM) classification of bladder cancer. *Urol. Oncol.*, **4** : 90-93.
- ROCHA T.A., NEAL MAULDIN G., PATNAIK A.K., BERGMAN P.J. (2000) Prognostic factors in dogs with urinary bladder carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.*, **14**, 486-490.
- SHAH J.B., MCKIERNAN J.M. (2004) Novel therapeutics in the treatment of bladder cancer. *Curr. Opin. Urol.*, **14**, 287-293.
- SAINT F., SALOMON L., QUINTELA R., CICCIO A., ABBOU C.C., CHOPIN D.K. (2002) Classification, facteurs favorisants, prévention et traitement des effets indésirables associés au bacille de Calmette-Guérin (BCG) dans le traitement des tumeurs superficielles de vessie. *Ann. Urol.*, **36**, 120-131.

- SCHENK-BRAAT E.A., BANGMA C.H. (2005) Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer. Immunol. Immunother.*, **54**, 414-423.
- SENGUPTA S., BLUTE M.L. (2006) The Management of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol.*, **67**, 48–55.
- SHARMA P., GNJATIC S., JUNGBLUTH A.A., WILLIAMSON B., HERR H., STOCKERT E. *et al.* (2003) Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun.*, **3**, 19-32.
- SPRINZL G.M.; KACANI L., SCHROTT-FISCHER A., ROMANI N., THUMFART W.F. (2001) Dendritic cell vaccines for cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.*, **27**, 247-255.
- STEPHENSON W.T., HOLMES F.F., NOBLE M.J., GERALD K.B. (1990) Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer*, **66**, 1630-1635.
- STONE E.A., GEORGES T.F., GILSON S.D., PAGE R.L. (1996) Partial cystectomy for urinary bladder neoplasia: surgical technique and outcome in 11 dogs. *J. Small Anim. Pract.*, **37**, 480-485.
- TANAKA F., FUJE T., TAHARA K., MORI M., TAKESAKO K., SETTE A., *et al.* (1997) Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Res.*, **57**, 4465-4468.
- THEILEN G.H., WORLEY M., BENJAMINI E. (1977) Chemoimmunotherapy for canine lymphosarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**, 607-610.
- TOTTERMAN T.H., LOSKOG A., ESSAND M. (2005) Immunotherapy of prostate and bladder cancer. *B.J.U. Int.*, **96**, 728-735.
- VALLI V.E., NORRIS A., JACOB R.M., LAING E., WITHROW S., MACY D., *et al.* (1995) Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *J. Comp. Pathol.*, **113**, 113-130.
- VARDAR E., GUNLUSOY B., MINARECI S., POSTACI H., AYDER A.R. (2006) Evaluation of p53 nuclear accumulation in low- and high-grade (WHO/ISUP classification) transitional papillary carcinomas of the bladder for tumor recurrence and progression. *Urol. Int.*, **77**, 27-33.
- WEISS G.R., O'DONNELL M.A., LOUGHLIN K., ZONNO K., LALIBERTE R.J., SHERMAN M.L. (2003) Phase I study of the intravesical administration of recombinant human interleukine-12 in patients with recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Immunother.*, **26**, 343-348.
- WELLER R.E., THEILEN G.H., MADEWELL B.R., CROW S.E., BENJAMINI E., VILLALOBOS A. (1980) Chemoimmunotherapy for canine lymphosarcoma: a prospective evaluation of specific and nonspecific immunomodulation. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 516-521.
- WHITESIDE T.L. (2002) Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin. Cancer. Biol.*, **12**, 43–50.
- WHITESIDE T.L. (2006) Immune suppression in cancer: Effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention, *Semin. Cancer. Biol.*, **16**, 3-15.

WITHROW S.J. (1996) Tumor of the urinary system. *In*: WITHROW S.J., MACEWEN E.G., Editors. *Small animal oncology*. 2nd ed. Philadelphia: WB saunders Co., 385-390.

YOSHIDA H., MOMOI Y., TAGA N., IDE K., YAMAZOE K., IWASAKI T. et al. (2003) Generation of canine dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *J. Vet. Med. Sci.*, **65**, 663-669.

ZHANG Y., STROOBANT V., RUSSO V., BOON T., VAN DER BRUGGEN P. (2002) A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens*, **60**, 365-371.