

ESSAI CLINIQUE D'UN VACCIN THERAPEUTIQUE CONTRE LA MALADIE DE CHAGAS CHEZ LE CHIEN

#5973DUM190

ERIC DUMONTEIL

Rapport technique Final, Décembre 2008.

Financement : Fondation Leon Mba/IMEA, France, et Conseil National des Sciences et de la Technologie (CONACYT), Mexique

RESUME

La maladie de Chagas, ou trypanosomiase Américaine, est causée par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi*. Elle est responsable de plus de 20,000 morts par an et son impact en santé publique est estimé à 676,000 années de vie ajustées avec incapacité (DALYs), ce qui en fait une des maladies parasitaires les plus importantes en Amérique Latine. En l'absence de traitement efficace, notre groupe a pu démontrer la validité du concept de vaccination thérapeutique dans le cas de la maladie de Chagas chez la souris, ouvrant ainsi une perspective très prometteuse pour le traitement de cette maladie. L'objectif général de cette étude a été d'évaluer l'efficacité et la biosécurité d'un vaccin d'ADN thérapeutique contre la maladie de Chagas chez le chien. Nos résultats montrent que les chiens infectés expérimentalement avec *T. cruzi* puis traités avec notre vaccin thérapeutique présentent des modifications de leur réponse immunitaire, avec un rapport IgG2/IgG1 plus élevé, indiquant une plus forte orientation Th1 de la réponse après le traitement. L'analyse de la pathologie cardiaque indique la présence d'une plus forte réaction inflammatoire dans le ventricule droit, signe possible d'une plus importante réaction immune cellulaire. D'autre part, les chiens traités ont présenté des altérations électrocardiographiques moindres que celles des chiens non traités. Ces résultats sont à comparer avec ceux observés lors de l'infection naturelle avec *T. cruzi* chez le chien, qui conduit à une pathologie moins sévère que l'infection expérimentale utilisée ici. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le traitement pourrait au moins ralentir la progression de la maladie de Chagas chez le chien.

Produits dérivés

Ce travail a par ailleurs permis la formation de deux étudiants de Master, la rédaction de trois articles scientifiques, et six présentations lors de conférences spécialisées, lesquels sont joints en annexe.

Mémoire de Master

Israel Quijano Hernandez (2007) Evaluacion del uso de los plasmidos pcDNA3-TSA1 y pcDNA3-Tc24 como inmunoterapia durante la fase aguda de la infeccion con *Trypanosoma cruzi* en perros. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma de Yucatán.

Vladimir Cruz Chan (2008) Estudio de la fase crónica en perros con infección natural de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma de Yucatán.

Articles scientifiques

Quijano-Hernandez I, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil (2009) Therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: a pilot clinical trial. *Annals NY Acad Sci*, 1149: 343-346.

Quijano-Hernandez I, Cruz-Chan JV, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil (2009) Evaluation of a therapeutic DNA vaccine encoding TSA-1 and Tc24 antigens for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. In revision. *Parasite Immunology*.

Cruz-Chan JV, M Bolio-González, R Colín-Flores, MJ Ramirez-Sierra, I Quijano-Hernandez, E Dumonteil (2009) Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. In revision. *Veterinary Parasitology*.

Présentations en conférences (*, poster et **, oral)

*Cruz-Chan JV, Bolio-Gonzalez M, Colin-Fores R, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil (2007) Pathological, parasitological and immunological findings of chronic phase in dogs with natural infection with T. cruzi lineage I. 9th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine, Merida, Yucatan, Mexico

**Quijano-Hernandez I, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil. (2007) Evaluation of a therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. 9th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine, Merida, Yucatan, Mexico

*Quijano-Hernandez I, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil. (2007) Efficacy of a therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. One Hunderd years of Tropical Medicine. London, UK.

*Quijano-Hernandez I, Bolio-Gonzalez M, Rodriguez-Buenfil J, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil. (2007) Efficacy of a therapeutic DNA vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. XII Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería, Morelia, Michoacan, Mexico.

- *Cruz-Chan JV, Bolio-Gonzalez M, Colin-Fores R, Ramirez-Sierra MJ, E Dumonteil (2008) Estudio de la fase crónica de la enfermedad de Chagas en modelo canino. 175 Aniversario de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatan. Merida, Yuc. Mexico.
- *Cruz-Chan JV, Bolio-Gonzalez M, Colin-Fores R, Ramirez-Sierra MJ, Quijano-Hernandez I, Dumonteil E (2008) Evaluation of the chronic phase in dogs naturally infected by *Trypanosoma cruzi*. 57th Annual Meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene. New Orleans, LA, USA.

ANTECEDENTS

La maladie de Chagas, ou trypanosomiase Américaine, est causée par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi*. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) environ 16-18 millions de personnes sont infectées, du sud du Brésil au sud des Etats Unis, et près de 100 millions sont en risque d'infection sur le continent Américain (22). La transmission à l'homme se fait principalement par l'intermédiaire de punaises hématophages, mais aussi par transfusion sanguine ou de façon directe mère-enfant (4, 13, 19, 21).

Après l'entrée du parasite à travers les microlésions de la peau ou des muqueuses, la maladie commence par une phase aiguë pendant laquelle les parasites flagellés (trypomastigotes) se multiplient dans le sang. Cette phase dure 30-40 jours et s'accompagne d'une réponse inflammatoire générale d'intensité et durée variables. Survient ensuite une phase indéterminée asymptomatique qui peut durer 5-40 ans. Les patients susceptibles (30/40% des personnes infectées) entrent ensuite dans une phase chronique caractérisée par un dommage tissulaire croissant, principalement dans le coeur, conduisant à la cardiopathie Chagassique typique (14). La magnitude de l'insuffisance cardiaque augmente avec le dommage cellulaire et conduit à un arrêt cardiaque et la mort des patients (1, 3, 15).

Le traitement est à base de nitrofurans (Nifurtimox) ou de nitroimidazoles (Benznidazole). Cependant, ces drogues ont une efficacité faible et limitée à la phase aiguë de l'infection, causant de plus des effets secondaires sévères, raisons pour lesquelles d'importants efforts sont nécessaires pour développer de nouvelles alternatives thérapeutiques (11, 18, 20). Nous avons pu démontrer antérieurement la validité du concept de vaccination thérapeutique dans le cas de la maladie de Chagas. L'administration de seulement deux doses de vaccins d'ADN codant pour les antigènes parasitaires TSA-1 ou Tc24 permet de réduire la parasitémie et la sévérité de la pathologie chez des souris BALB/c et ICR infectées avec une dose létale de *T. cruzi* (8). Une analyse phénotypique des lymphocytes par cytométrie de flux suggère que le vaccin thérapeutique réoriente ou redirige la réponse immunitaire vers un type Th1, caractérisé par une augmentation importante du nombre de cellules T CD8⁺ productrices d'IFN γ (23). Une étude comparative de plusieurs candidats de vaccins codant pour différents antigènes nous a également permis d'identifier les vaccins présentant la meilleure activité thérapeutique chez la souris (17).

Ces vaccins d'ADN thérapeutiques semblent donc être une alternative très prometteuse pour le traitement de la maladie de Chagas. L'évaluation de l'efficacité et de la

biosécurité de nos vaccins thérapeutiques sur d'autres modèles animaux est donc indispensable avant d'initier des essais cliniques chez l'homme. Le chien est un important réservoir domestique du parasite et de nombreuses études sérologiques et parasitologiques ont mis en évidence des taux d'infection naturelle chez le chien de l'ordre de 10-20% dans différentes régions des Amériques (5, 10, 12). Ainsi, la validation de nos résultats chez le chien permet d'une part de développer un vaccin thérapeutique à usage vétérinaire, et d'autre part peu fournir des données indispensables sur l'efficacité et la biosécurité de ce vaccin afin d'initier de futurs essais cliniques chez l'homme. Ainsi, ce projet contribue directement au développement de nouvelles possibilités de contrôle de cette parasitose tropicale.

OBJECTIF

L'objectif général de ce projet est d'évaluer l'efficacité et la biosécurité d'un vaccin d'ADN thérapeutique contre la maladie de Chagas chez le chien

RESULTATS

Le travail s'est réalisé à l'Université Autonome du Yucatan, Mexique, avec la participation du Centre de Recherche de cette institution et la Faculté de Médecine Vétérinaire. Un total de 8 chiens a été inclus dans l'étude après vérification de l'absence d'infection par *T. cruzi* antérieure à la présente étude (sérologie et PCR). Les chiens furent ensuite infectés expérimentalement avec 50,000 parasites/kg, et ils reçurent 500 µg de vaccin thérapeutique après 15 et 30 jours d'infection (ou le plasmide vide comme contrôle). Des échantillons d'animaux provenant du Centre de Contrôle Canin de la Ville de Mérida (post-mortem) furent également analysés afin de déterminer les caractéristiques de l'infection naturelle par *T. cruzi*.

L'analyse de la parasitémie montre que tous les chiens infectés présentèrent une parasitémie détectable par observation directe au microscope à partir de 21 jours après l'infection, et ce jusqu'à 42 jours. Cependant, il n'a pas été possible de quantifier le nombre de parasites présents, car celui-ci est resté très bas. Il n'y a par ailleurs pas eu de différence entre le groupe traité et le groupe contrôle en ce qui concerne la période de parasitémie.

Le niveau d'IgG anti-*T. cruzi* a été mesuré par ELISA, toutes les 2 semaines durant la durée de l'expérience. Une partie des animaux des deux groupes sont devenus seropositifs à partir de 42 jours après l'infection, et leur niveau d'IgG s'est maintenu durant le reste de l'expérience. Le groupe de chiens traités avec le vaccin ADN ont cependant présenté un niveau d'anticorps moins élevé que les chiens contrôles non-traités, suggérant une plus faible réponse humorale. L'analyse des isotypes d'anticorps IgG1 et IgG2 indique que le rapport IgG2/IgG1 est plus élevé chez les chiens traités avec le vaccin thérapeutique, ce qui suggère une orientation préférentielle de la réponse immunitaire de type Th1.

Finalement, le suivi pathologique des chiens a indiqué qu'un animal de chaque groupe a été victime de mort subite (au jours 46 et 47 après l'infection, respectivement). Chez les animaux restants, seul un chien du groupe non traité n'a pas présenté d'altération électrocardiographique, alors que ce fut le cas de deux chiens du groupe traité. Aussi, trois chiens du groupe contrôle présentèrent des altérations marquées de leur

électrocardiogramme, incluant une tachycardie ventriculaire, un complexe ventriculaire prématuré, et un blocage de la branche droite, tous typiques de la cardiopathie Chagassique. Ces premiers résultats suggèrent donc que le traitement avec un vaccin d'ADN thérapeutique pourrait au moins retarder la progression de la cardiopathie Chagassique chez le chien, en stimulant la réponse immunitaire (possiblement cellulaire).

Cette hypothèse semble confirmée par l'analyse histopathologique du tissu cardiaque, qui montre que la réponse inflammatoire est plus importante dans le ventricule droit des chiens traités en comparaison avec les animaux contrôles. Cependant, aucune différence n'a été observée dans les autres parties du cœur analysées (ventricule gauche, auricules droite et gauche, et paroi interventriculaire). Finalement, l'analyse moléculaire de la présence de *T. cruzi* dans le cœur par PCR a confirmé l'infection dans les deux groupes de chiens.

Ces résultats sont également à contraster avec ceux obtenus de l'analyse d'échantillons de chiens infectés naturellement par le parasite. En effet, l'analyse post-mortem de 9 chiens infectés indique qu'ils présentent une réponse immunitaire humorale de magnitude similaire, mais avec un niveau de IgG2 plus faible, signe d'une orientation préférentielle de type Th2. Cependant, le niveau de dommage histologique de ces animaux fut bien moindre que ceux infectés expérimentalement, ce qui indique que la charge infectieuse utilisée dans notre essai a été très importante en comparaison avec celle d'une infection naturelle. D'autre part, une corrélation positive significative a été observée entre les niveaux de IgG1 et la cardiopathie des chiens infectés naturellement et mesurée par l'indice cardiaque (poids du cœur/poids du chien).

MATERIELS ET METHODES

Infection expérimentale avec *T. cruzi*. Un total de 8 chiens furent inclus dans l'étude, qui a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université Autonome du Yucatan. Les animaux furent infectés avec 50,000 trypanostigotes sanguins de la souche H4 (2). Pour déterminer les effets du traitement sur les parasites circulants, la parasitémie a été déterminée chaque semaine pendant 2 mois par observation microscopique directe. Des biopsies et échantillons de sang de chiens ont été aimablement fournis par le Centre de Contrôle Canin de la Ville de Mérida afin de servir de contrôles additionnels de l'infection naturelle.

Formulation du vaccin d'ADN. Les vaccins codant pour les antigènes de *T. cruzi* TSA-1 et Tc24 décrits dans des travaux antérieurs ont été utilisés dans ce travail (8, 17, 23). Les plasmides ont été purifiés à partir d'une culture d'*Escherichia coli* grâce à un kit de purification Endofree de Qiagen et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les chiens reçurent deux doses intramusculaires de 500 µg d'ADN (250 µg de chaque plasmide) avec 500 µg de phosphate d'aluminium, un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 par les vaccins d'ADN (16).

Détermination des anticorps par ELISA. Les niveaux d'anticorps IgG et sous-types d'IgG ont été mesurés avant et pendant l'infection et traitement afin de déterminer les changements induits par le traitement. Un antigène total de *T. cruzi* a été déposé dans des microplaques (0.5 µg par puit). Après incubation de différentes dilutions de sérum, un

anticorps secondaire anti-IgG (ou sous-types d'IgG) de chien marqué avec la phosphatase alcaline (SEROTEC, USA) a été ajouté et l'activité de la phosphatase a été révélée par le p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) comme substrat. Les plaques ont été lues à 405 nm (Bio-Rad 550 reader)(9). De la même façon, des anticorps secondaires anti-IgG1 et anti-IgG2 ont été utilisés pour déterminer le niveau de ces isotypes d'anticorps.

Electrocardiogrammes. Les chiens furent placés sur une table d'examen, et les électrodes cutanées furent placées aux coudes et genoux des animaux en position de marche sur leurs quatre pattes. Après 5 à 10 min de stabilisation du rythme cardiaque, 1 min d'électrocardiogramme a été enregistrée à 50 mm/s et 1 mV/cm. Les arythmies ont été diagnostiquées en analysant la dérivée II des électrocardiogrammes.

Analyse histopathologique

Des échantillons de tissus d'environ 1.0 x 1.0 x 0.2 cm des cinq parois du cœur (Auricule droite et gauche, ventricule droit et gauche, paroi interventriculaire) ont été fixés dans de la formaline à 10%, déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des sections de 5 µm ont été colorées à l'éosine et l'hématoxyline pour leur évaluation histologique. Des images digitales de chaque paroi ont été prises au microscope avec un objectif 10X et la densité de cellules inflammatoires a été quantifiée par analyse d'image avec le programme Multispec 3.0 (Purdue University, IN, USA) (17, 23). La densité de cellules inflammatoires de chaque image a été calculée en soustrayant la densité moyenne de noyaux de myocytes des parois correspondantes de chiens séronégatifs à la densité de noyaux totaux des chiens infectés (considérés comme myocytes + cellules inflammatoires).

Détection de l'ADN de *T. cruzi* par PCR

L'ADN de cœur a été purifié à l'aide d'un kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN), et testé pour la présence d'ADN de *T. cruzi* par PCR comme décrit antérieurement (6) en utilisant les primers TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCCACAAGGGTGC et TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG (7).

REFERENCES

1. **Andrade, Z. A.** 1991. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol* **142**:126-129.
2. **Barrera-Perez, M. A., M. E. Rodriguez-Felix, E. Guzman-Marin, J. Zavala-Velázquez, and E. Dumonteil.** 2001. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico. *Rev. Biomédica.* **12**:224-231.
3. **Bestetti, R. B., and G. Muccillo.** 1997. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **60**:187-193.
4. **Brabin, L.** 1992. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **87**:73-79.
5. **Bradley, K. K., D. K. Bergman, J. P. Woods, J. M. Crutcher, and L. V. Kirchhoff.** 2000. Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. *J Am Vet Med Assoc* **217**:1853-1857.
6. **Comes, A. M., J. F. Humbert, J. Cabaret, and L. Elard.** 1996. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. *Vet Res* **27**:333-342.

7. **Cummings, K. L., and R. L. Tarleton.** 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* **129**:53-59.
8. **Dumonteil, E., J. Escobedo-Ortegon, N. Reyes-Rodriguez, M. J. Ramirez-Sierra, and A. Arjona-Torres.** 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. *Infect Immun* **72**:46-53.
9. **Dumonteil, E., M. J. Ramirez-Sierra, J. Escobedo-Ortegon, and M. R. Garcia-Miss.** 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* **21**:2161-2168.
10. **Estrada-Franco, J. G., V. Bhatia, H. Diaz-Albiter, L. Ochoa-Garcia, A. Barbabosa, J. C. Vazquez-Chagoyan, M. A. Martinez-Perez, C. Guzman-Bracho, and N. Garg.** 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis* **12**:624-630.
11. **Kinnamon, K. E., B. T. Poon, W. H. Hanson, and V. B. Waits.** 1998. Activity of anticancer compounds against *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:804-806.
12. **Lauricella, M. A., C. Wisnivesky Colli, R. Gurtler, R. Petersen, M. Bujas, and E. L. Segura.** 1993. Standardization of serological tests for detecting anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **88**:413-417.
13. **Moncayo, A.** 1997. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World Health Stat Q* **50**:195-198.
14. **Nunes Mdo, C., M. Barbosa Mde, V. A. Brum, and M. O. Rocha.** 2004. Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas' dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **94**:79-85.
15. **Rassi, A., Jr., A. Rassi, and W. C. Little.** 2000. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* **23**:883-889.
16. **Rosado-Vallado, M., M. Mut-Martin, M. R. Garcia-Miss, and E. Dumonteil.** 2005. Aluminium phosphate potentiates DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* **23**:5372-5379.
17. **Sanchez-Burgos, G., G. Mezquita-Vega, J. Escobedo-Ortegon, M. J. Ramirez-Sierra, A. Arjona-Torres, M. M. Rodrigues, A. Ouaisi, and E. Dumonteil.** 2007. Comparative efficacy of DNA vaccines encoding various *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEMS Microbiol Med Immunol* **50**:333-341.
18. **Sepulveda-Boza, S., and B. K. Cassels.** 1996. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica* **62**:98-105.
19. **Torrico, F., C. Alonso-Vega, E. Suarez, P. Rodriguez, M. C. Torrico, M. Dramaix, C. Truyens, and Y. Carlier.** 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* **70**:201-209.
20. **Urbina, J. A., G. Payares, J. Molina, C. Sanoja, A. Liando, K. Lazard, M. M. Piras, R. Piras, N. Perz, P. Wincker, and J. F. Ryley.** 1996. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* **273**:969-971.
21. **WHO.** 1998. Chagas disease. Interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec* **73**:1-4.
22. **WHO.** 1997. Tropical disease research. Progress 1995-1996.
23. **Zapata-Estrella, H., C. Hummel-Newell, G. Sanchez-Burgos, J. Escobedo-Ortegon, M. J. Ramirez-Sierra, A. Arjona-Torres, and E. Dumonteil.** 2006. Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunol Lett* **103**:186-191.