

Vaccination ; Thérapeutiques immunologiques

Utilisation des Adénovirus en Immunothérapies et Vaccination

Les adénovirus sont avec les rétrovirus les vecteurs de prédilection pour la thérapie génique. En effet, ces virus à ADN (adénovirus) peuvent transférer de grandes portions d'ADN et sont capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires avec une efficacité proche de 100%. A la différence de la plupart des rétrovirus, les adénovirus sont capables d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, ne s'intègrent que très rarement au génome de la cellule infectées et peuvent être facilement produits en grande quantité, en culture. Ces virus sont peu pathogènes provoquent cependant de fortes réactions inflammatoires et immunitaires. Ces caractéristiques, intéressantes pour les techniques de thérapie génique *in situ* et *in vivo*, ont également été retenues pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques immunologiques ou la génération de nouveaux candidats vaccins.

I. Induction *in vivo* d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène porté par le vecteur adénoviral recombinant

a) Caractéristiques de la réponse induite

(d'après Yang, T.C., *et al.* (2003) *J. Virology*. 77:13407)

Dans cette première étude, les auteurs ont généré un vecteur adénoviral, déficient pour la réplication après délétion des gènes E1 et E3, et porteur d'une séquence cDNA codant pour la protéine de fusion SIINFEKL-Luc. SIINFEKL est un épitope H-2Kb restreint dérivé de l'ovalbumine de l'œuf de poulet fusionné en position N-terminale avec la luciférase. Le pouvoir immunogène du vecteur est évalué chez la souris après injection par voie intramusculaire de 10^8 pfu de AdSIINFEKL-Luc.

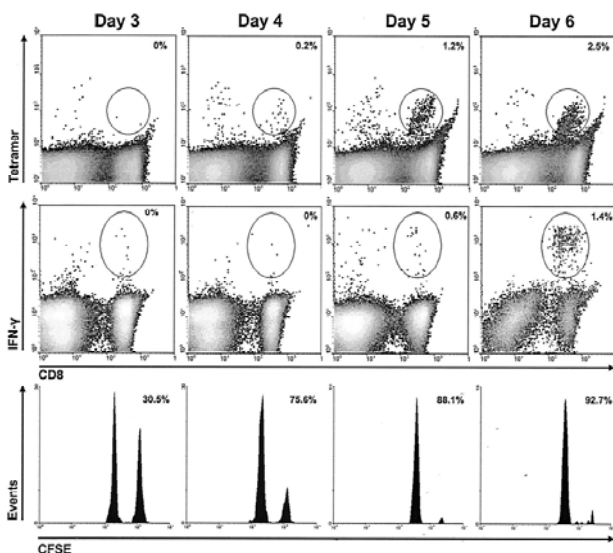


Figure 1 : Analysis of effector function within ileac lymph nodes at early times postimmunization.

Cells were obtained from the regional lymph nodes 3 to 6 days following intramuscular immunization with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. Upper panels, cells were stained directly with tetramer, and the number in the upper-right corner of each tetramer plot is the frequency of SIINFEKL-reactive $CD8^+$ T cells (determined using the gate shown)/total $CD8^+$ cells in the experimental group minus the frequency of SIINFEKL-reactive $CD8^+$ T cells/total $CD8^+$ cells in naïve controls; Middle panels, cells were immediately restimulated with SIINFEKL or KAVYNFATM peptide for intracellular cytokine staining, and the number in the upper-right corner is the frequency of IFN- γ -producing $CD8^+$ T cells (determined using the gate shown)/total $CD8^+$ following stimulation with SIINFEKL minus the frequency of IFN- γ -producing $CD8^+$ T cells/total $CD8^+$ cells following stimulation with KAVYNFATM; Lower panels, CFSE-labeled target cells were adoptively transferred into immunized recipient for *in vivo* CTL 4 h prior to harvesting tissues, and the number in the upper-right corner represents the percent specific lysis relative to naïve controls. Target were coated with either SIINFEKL (specific peptide) or KAVYNFATM (irrelevant peptide) and labeled with 5 and 0.5 μ M CFSE (Molecular Probes), respectively. The two target cell populations were mixed at a 1:1 ratio and injected intravenously into mice. These histograms and density plots are representative of five mice, and the calculated values in all panels represent the means for the five mice.

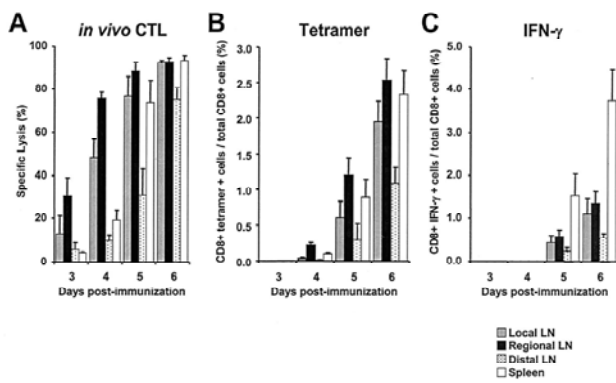


Figure 2 : Analysis of effector function within lymph nodes and spleens at early times postimmunization.

Cells were obtained from local, regional, and distal lymph nodes and spleens 3 to 6 days following intramuscular immunization with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. On the day of each harvest, CFSE-labeled target cells were adoptively transferred into mice for the *in vivo* CTL assay, and tissues were harvested 4 h later. (A) *In vivo* CTL assay; (B) tetramer analysis with Kb/SIINFEKL; (C) intracellular cytokine stain analysis for IFN- γ after 5 h of peptide stimulation *ex vivo*. Each histogram represents the mean $\pm$ standard error of the mean for five mice

The LNs were separated into the following groups based on their relative distance from the injection site: (i) local (popliteal and inguinal), (ii) regional (ileac), and (iii) distal (axial and brachial).

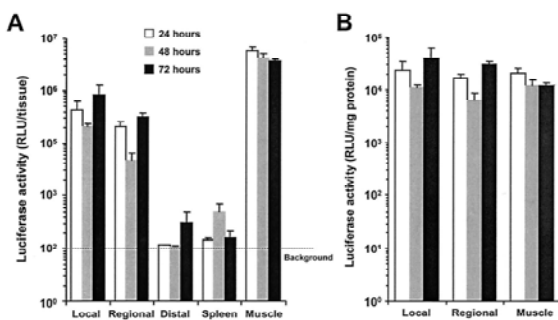


Figure 3 : Gene expression *in vivo* following intramuscular injection of AdSIINFEKL-Luc.

Muscles, lymph nodes, and spleens were harvested 24 (open bars), 48 (grey bars), and 72 h (closed bars) following intramuscular injection with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. Three groups of lymph nodes were harvested: local lymph nodes, regional lymph nodes, and distal lymph nodes. Luciferase activity was measured in tissue homogenates. (A) Luciferase activity per tissue. (B) Luciferase activity per tissue normalized to the amount of protein in the homogenate. Each histogram represents the mean [plusmn] standard error the mean for three to six samples.

Question 1. Justifiez la création d'un tel vecteur pour l'évaluation des réponses immunitaires induites.

Question 2. Présentez le principe et l'avantage des tests immunologiques utilisés dans la Figure 1 pour évaluer la réponse effectrice CD8 induite.

Question 3. D'après les Figure 2 et Figure 3, décrivez les caractéristiques de la réponse induite : expression antigénique, cinétique de la réponse CTL, localisation et état d'activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifique de l'épitope.

b) Application à la vaccination antitumorale

(d'après Toes, R.E.M., et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94:14660)

La stratégie vaccinale anti-tumorale repose ici sur le ciblage spécifique des protéines oncogènes, associées généralement à la tumorigenèse et au développement du cancer. Or pour ce type d'immunothérapie, l'injection dans l'organisme de vecteurs viraux porteurs des gènes codant pour ces oncoprotéines n'est pas envisageable en raison des forts risques de tumorigenèse associée. C'est pourquoi est ici développée une stratégie vaccinale utilisant des adénovirus recombinants délétés en E1 et porteurs d'épitopes dérivés de diverses oncoprotéines connues. Ces différents épitopes restreints au système H-2 (rAd-1) ou HLA (rAd-2) sont assemblés sur un même mini-gène, utilisé pour créer les adénovirus recombinants respectifs (**Figure 4**).

Question 4. Indiquez les principales étapes nécessaires pour l'activation des CTL après injection du vecteur adénoviral

Les souris sont immunisées par voie intra-péritonéale avec 10^8 pfu de l'adénovirus recombinant rAd-1 ou r-Ad2. Deux semaines plus tard, les réponses CTL spécifiques des épitopes dérivés de E1 sont analysées (**Figure 5**) et l'immunité protectrice anti-tumorale est déterminée après injection d'épreuve de cellules tumorales exprimant les protéines Ad5E1A (**Figure 6**).

Question 5. Interprétez la **Figure 5**. Indiquez les résultats attendus si les splénocytes des souris immunisées sont restimulés avec les cellules tumorales HPV16-MEC.

Question 6. Classez et commentez l'efficacité des différents immunogènes utilisés pour induire une immunité anti-tumorale protectrice.

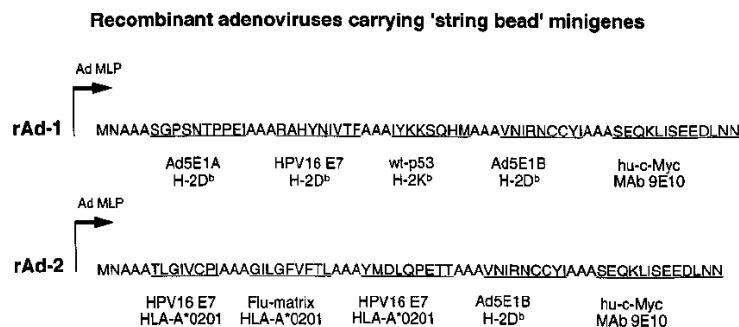


Figure 4 : Minigenes encoding several CTL epitopes, linked by a spacer of three alanines.

The first minigene (rAd-1) encodes the H-2Db-restricted peptide E1A234-243, the H-2Db-restricted peptide HPV16E749-57, the H-2Kb-restricted peptide p53158-166, the H-2Db-restricted peptide E1B192-200, and a Myc tag. The second minigene (rAd-2) encodes the HLA-A*0201-restricted CTL epitope HPV16 E786-93, the HLA-A*0201-restricted peptide Flu-matrix58-66, the HLA-A*0201-restricted peptide HPV16 E711-20, the H-2Db-restricted peptide E1B192-200, and a Myc tag. Both minigenes are placed behind the Ad5 major late promoter (Ad-LMP), which in this configuration is linked to the Ad5 immediate early enhancer, resulting in immediate early expression of the minigenes.

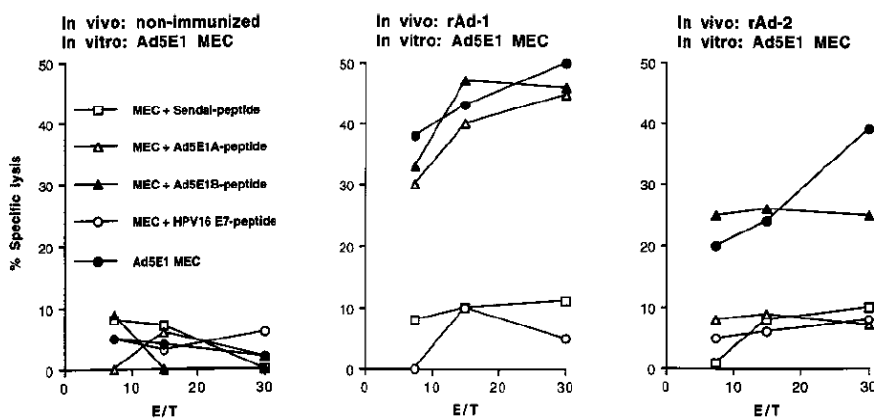


Figure 5 :

B6 mice were left nonimmunized, were immunized with rAd-1, harboring minigene 1, or were immunized with rAd-2, harboring minigene 2. Two weeks later, spleen cells of these animals were taken and restimulated with Ad5E1-transformed tumor cells to propagate E1A- and E1B-specific CTL. Lytic activity of bulk CTL cultures was tested 6 days later on Ad5E1 MEC, untransformed B6 MEC loaded with the Sendai-virus encoded control CTL epitope FAPGNYPAL, the E1A-encoded CTL epitope, the E1B-encoded CTL epitope, or the HPV16 E7-encoded CTL epitope. Percent specific lysis at different effector to target cell ratios is shown.

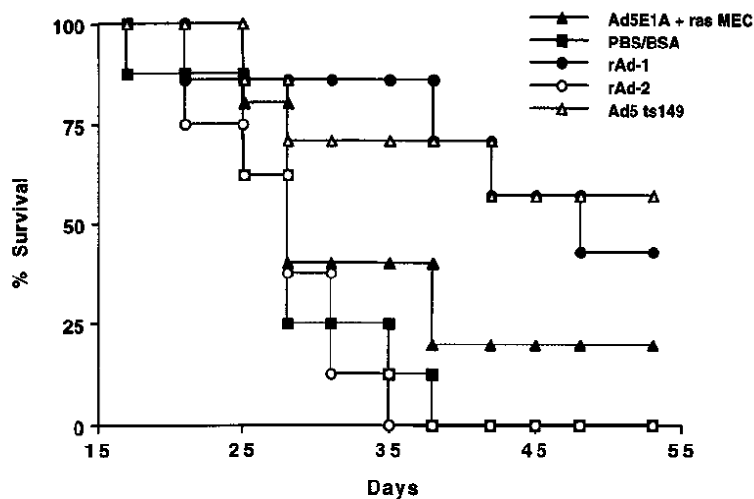


Figure 6 :

B6 mice were immunized intraperitoneally with rAd-1 (n = 7), rAd-2 (n = 8), or the Ad5 mutant (Ad5E1A-positive) Ad5ts149 (n = 7) or were injected with PBS/BSA (n = 8) only. Two weeks later, the mice received a subcutaneous challenge of 0.4×10^6 Ad5E1A + Ras cells.

II. Stratégies de vaccination « prime-boost adénoviral »

(d'après Tritel, M., *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:2538)

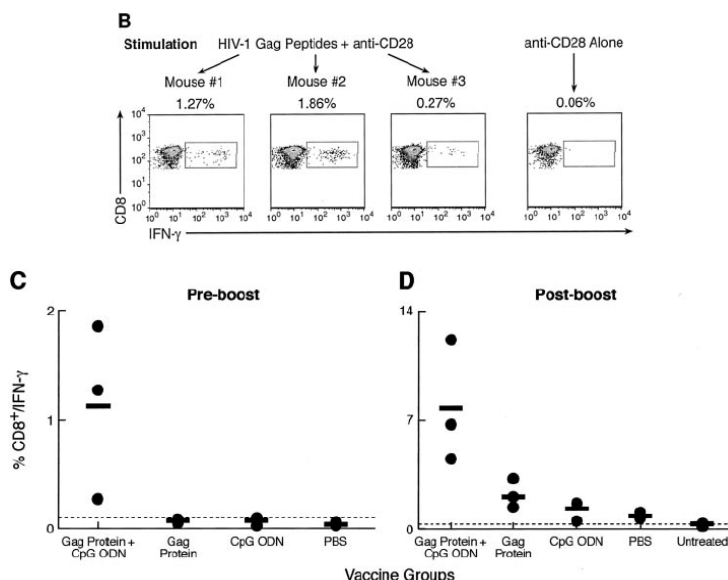
Alors que les réponses immunitaires humorales sont efficacement induites après injection d'agents pathogènes vivants atténués ou inactivés, ou de vaccins sous-unitaires protéiques ; les vaccins vivants atténués sont les principaux candidats pour induire des réponses immunitaires cellulaires efficaces. Plus récemment, dans le cadre de la vaccination génétique, la technique de « prime-boost » semble être une stratégie efficace pour induire à la fois une réponse cellulaire et humorale. Cette approche consiste à injecter une première fois l'Ag sous forme ADN (prime) suivi de l'administration d'un vecteur viral recombinant exprimant ce même Ag (boost). Les adénovirus peuvent constituer des vecteurs de choix pour la réalisation du boost. Plus récemment, il a pu être montré que l'injection simultanée de séquences riches en CpG, mixées aux séquences d'ADN codant pour l'Ag lors du prime, permet d'amplifier considérablement les réponses immunitaires induites.

Dans cette étude, les auteurs ont cherché à caractériser les réponses immunitaires dirigées contre Gag du HIV, lors d'une stratégie vaccinale proche de celle du « prime-boost classique », mais injectant en première intention et de façon répétée la protéine Gag entière en présence ou non de séquence CpG, puis un adénovirus recombinant exprimant la protéine Gag de HIV-1. Le protocole d'immunisation est le suivant : 3 injections sous-cutanées à 3 semaines d'intervalle de (i) la protéine Gag en présence de CpG, (ii) de la protéine Gag seule, (iii) de CpG uniquement ou en contrôle de PBS. Une partie des souris est sacrifiée 10 jours après le dernier prime (Pre-boost) alors que l'autre est injectée 4 semaines après avec l'adénovirus recombinant. L'analyse Post-boost est réalisée 1,5 (peak), 6 (memory 1) ou 11 semaines (memory 2) après le boost adénoviral.

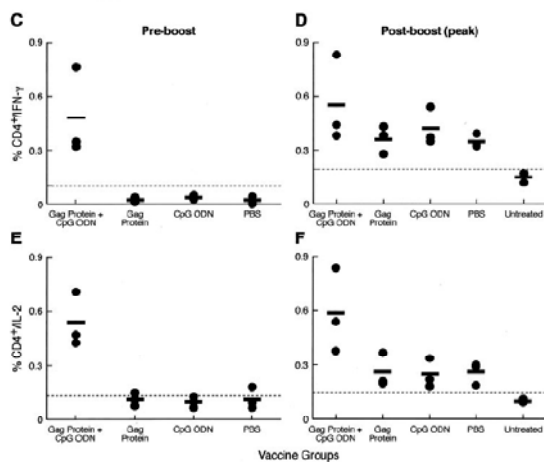
Question 1. Précisez les conséquences de l'injection de séquences CpG lors du prime.

Question 2. Quel est, selon vous, le principal intérêt d'utiliser pour le prime l'Ag immunisant sous une forme protéique et non une séquence d'ADN.

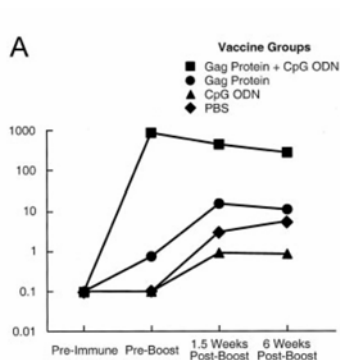
Question 3. Décrivez et interprétez l'effet du boost adénoviral sur les réponses CD4, CD8 et anticorps spécifiques de Gag HIV-1.

**Figure 7 :**

The frequency of HIV-1 Gag-specific, IFN γ ⁺ cells within CD8⁺ T cells following protein + CpG ODN immunization. Cells were initially gated on lymphocytes using forward/side scatter. CD4⁺, CD8⁺ cells were then gated and the frequency of IFN γ ⁺ cells within this population was determined. B, Representative FACS plots of preboost responses. Mice were vaccinated as indicated. Splenocytes were prepared and stimulated with HIV-1 Gag pooled peptides and costimulatory Ab (anti-CD28) or anti-CD28 alone. CD8⁺ and IFN γ ⁺ cells were detected by intracellular cytokine staining. C and D, Graphic depiction of pre-boost (C) and postboost (D) responses. •, Individual mice; horizontal bars, group averages. The background (dotted line) is defined as the percentage of cells responding to costimulatory Ab alone.

**Figure 8 : Frequency of HIV-1 Gag-specific, IFN γ ⁺ and IL-2⁺ cells within CD4⁺ cells following protein + CpG ODN immunization.**

C and D, Graphic representation of the frequency of IFN γ ⁺ cells within the CD4⁺ T cell population before (C) and after (D) adenovirus boost. Values for individual mice (•) and group averages (horizontal bars) are depicted. E and F, Graphic representation of the frequency of IL-2⁺ cells within the CD4⁺ T cell population before (E) and after (F) adenovirus boost.

**Figure 9 :**

A, HIV-1 Gag-specific Ab responses following protein + CpG ODN prime-boost immunization. Mice were vaccinated as indicated before and were bled 1.5 wk after the third priming injection or 1.5 or 6 wk after the adenovirus boost. Anti-HIV-1 Gag Ab titers (total IgG) were determined by ELISA.

III. Utilisation in vitro des adénovirus comme agent de transfection des APC et déclenchement des réponses immunitaires in vivo

(d'après Brown, K. *et al.* (2003) *J. Immunology* 171:6875)

De façon plus classique, les adénovirus peuvent être utilisés *in vitro* pour transduire efficacement les APC et notamment les cellules dendritiques (DC). L'immunisation est alors réalisée par réinjection des DC transfectées présentant l'antigène. Dans cette étude, les auteurs ont immunisé des singes non-infectés par SIV et ont analysé les réponses immunitaires induites après plusieurs injections

intradermales ou intranodales des DC transduites par l'adénovirus porteur des séquences p17 ou p45 de la protéine Gag du SIV.

Question 1. Proposez des expériences qui permettraient de vérifier l'expression de Gag dans les DC et de mettre en évidence la bonne présentation des épitopes dérivés ?

Question 2. Précisez l'importance des conditions de culture des DC.

Question 3. A partir des Figure 10 et Figure 11, analyser la spécificité des réponses obtenues.

L'injection répétée des adénovirus peut, selon la souche virale, poser problème en raison de la préexistence ou de la génération d'anticorps neutralisants dirigés contre l'adénovirus. Cette immunité acquise peut limiter considérablement l'efficacité du transfert de gène. Les auteurs ont, ici, cherché à déterminer s'il la réponse lymphocytaire T spécifique des adénovirus pouvait limiter le transfert des DC transduites par les adénovirus. La réponse spécifique de l'adénovirus est étudiée chez le singe, avant et après immunisation, à partir des PBMC restimulés en présence de DC transduites par L'adénovirus recombinant, l'adénovirus natif ou en présence de DC immatures.

Question 4. Interprétez la Figure 12 et précisez les conséquences de l'injection répétée des DC transduites sur l'immunité acquise.

Question 5. Quels tests complémentaires permettraient d'évaluer in vivo l'absence d'interférence des injections répétées des DC avec leur capacité à stimuler efficacement le système immunitaire ?

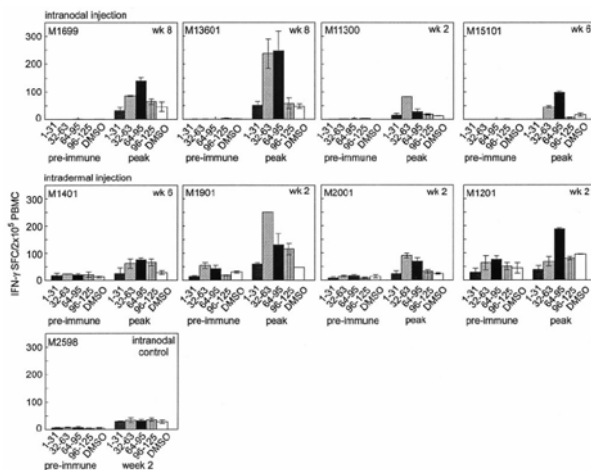


Figure 10 : DC-based vaccination results in broad Gag-specific T cell responses in monkeys.

PBMC were incubated with DMSO or pools containing SIV Gag peptides p1-p31, p32-p63, p64-p95, or p96-p125, and IFN γ -producing cells were quantified by ELISPOT 24 h later. Shown are responses from samples taken before immunization (preimmune) and at the time of peak response (peak) in monkeys immunized by intradermal or intranodal injection with Gag-expressing DC, or following intranodal injection of DC infected with the control vector Ad ψ 5. Graphs are composites of several experiments, and data are expressed as mean $\pm$ SEM of duplicate or triplicate samples. SFC = spot-forming cell. DC were cultured from purified blood monocytes of normal monkeys, as described. For adenoviral infection of DC, viruses were added directly to cells in culture at a multiplicity of infection of 200 and incubated for 45 min at room temperature in a reduced volume of medium. Cells were cultured for 24 h, washed to remove free virus, and then cultured with GM-CSF and IL-4 and recombinant human trimeric CD40 ligand (1 μ g/ml; Immunex, Seattle, WA) for an additional 16 h. Individual 15-mer peptides overlapping by 11 aa representing the Gag sequence of SIVmac239 (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program) were dissolved in DMSO at 10 mg/ml and used in pools of 30–32 peptides (final concentration 3.1–3.3 μ g/ml).

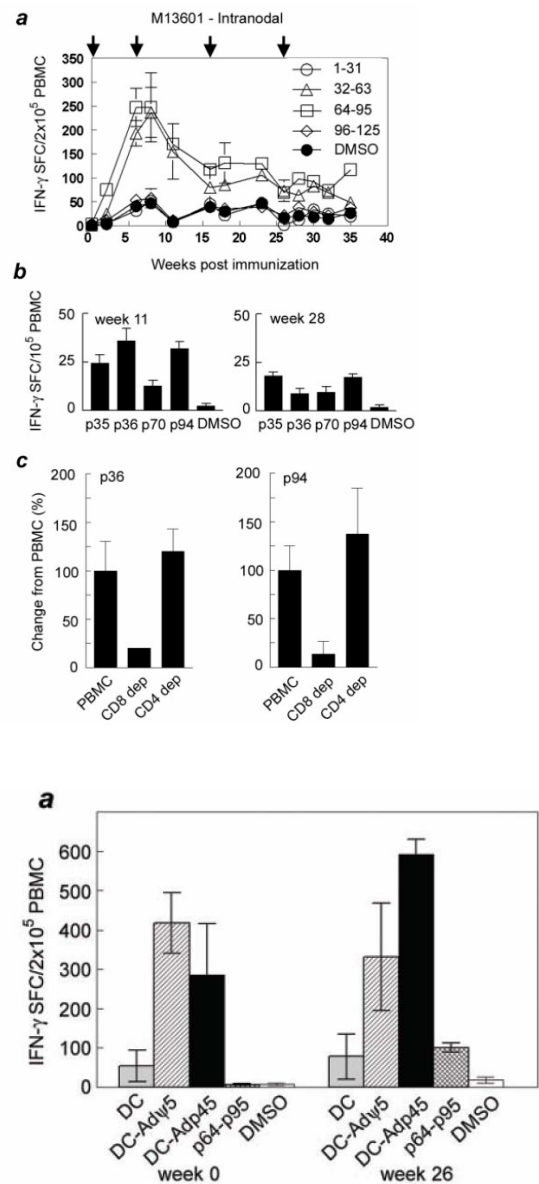


Figure 11 :

a, IFN γ responses to each of four Gag peptide pools or DMSO during the course of vaccination of M13601. Immunizations were given at times marked by arrows. Graphs are composites of several experiments, and data are expressed as mean $\pm$ SEM of duplicate or triplicate samples.

b, IFN γ responses of PBMC to individual peptides or DMSO tested at times indicated after vaccination. Shown are mean $\pm$ SEM or triplicate determinations.

c, Relative IFN γ response of PBMC with and without depletion of CD8⁺ or CD4⁺ T cells in an ELISPOT assay to the indicated peptides. Shown are mean $\pm$ SEM of triplicate determinations. SFC = spot-forming cells.

Figure 12 :

a, PBMC from monkey M13601 taken at the indicated times before and after vaccination were cultured with CD40 ligand-matured autologous DC with or without prior infection with Ad ψ 5 or Adp45. Alternatively, PBMC were cultured with peptides p64-p95 or DMSO control. IFN γ -secreting cells were detected by ELISPOT assay. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicate determinations. SFC = spot-forming cells.