

Université Pierre et Marie Curie
Master BMC 2eme année

Immunothérapie Cellulaire et Génique
B. Bellier / F. Lemoine

Examen Janvier 2007

A partir du concept de manipulation du système immunitaire pour combattre le cancer ont été développées différentes approches d'immunothérapies. Bon nombre de ces thérapies ont été appliquées en clinique et principalement chez des patients atteints de mélanome de grade IV. L'objectif essentiel de ces différentes stratégies est de générer ou de réactiver des effecteurs anti-tumoraux, efficaces dans la lutte anti-tumorale. Les immunothérapies classiques, actives ou passives, visent avant tout à obtenir un nombre important d'effecteurs anti-tumoraux de type lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Cependant, la fréquence des cellules spécifiques des antigènes tumoraux n'est pas l'unique paramètre important ; doivent-être également pris en considération leur spécificité, leur affinité, leur avidité et leur activité. De plus, les mécanismes immunorégulateurs et homéostatiques qui limitent l'efficacité des immunothérapies doivent être déjoués. Fort de ces conclusions, l'équipe de Rosenberg a développé une approche clinique d'immunothérapie complexe qui consiste à transférer un nombre important de lymphocytes T dont la spécificité antigénique a été modifiée par transfert de gène TCR anti-MART-1, chez des patients atteints de mélanome et qui ont subi au préalable un conditionnement lympho-déplétant puis des injections de peptide MART-1 et d'IL-2 (Morgan et al ; Science, Oct 2006). La caractérisation des clones ainsi obtenus a fait l'objet d'une étude toute particulière (Johnson et al, J.Immunol, 2006).

1. Justifiez brièvement le choix privilégié des mélanomes dans les approches d'immunothérapies ?
2. Quelles sont les différentes approches thérapeutiques classiques qui sont combinées dans cette nouvelle stratégie ? Justifiez chacune d'elles ?

Pour sélectionner le TCR spécifique de haute affinité pour MART-1, différents clones dérivés des TIL (Lymphocytes Infiltrant la Tumeur) ont été générés à partir de tumeurs prélevées chez trois patients HLA-A2 ayant un mélanome et qui ont développé une réactivité anti-tumorales lors des immunothérapies précédentes. La réactivité des 576 clones de TIL, obtenus par dilution limite, a été testée contre différents antigènes tumoraux en mesurant par ELISA la sécrétion d'IFN γ après co-culture avec des cellules présentatrices T2 chargées avec le peptide d'intérêt (Tableau 1). Afin de comparer l'activité des différents clones spécifiques de MART-1, des expériences de co-culture en présence de cellules T2 chargées avec des quantités de peptide décroissantes ont ensuite été réalisées (Figure 1A). Les clones ont également été testés

pour leur capacité à réagir contre une lignée tumorale de mélanome HLA-A2 (Figure 1B et C).

Patient (192 clones each)	No. of Reactive Clones ^a			
	MART-1: 27-35	gp100: 154-162	gp100: 209-217	gp100: 280-288
1-D	14; 7.3%	1; 0.5%	1; 0.5%	9; 4.7%
2-M	13; 6.8%	1; 0.5%	1; 0.5%	11; 5.7%
3-S	14; 7.3%	0; 0%	1; 0.5%	11; 5.7%
Total (576 clones)	41; 7.1%	2; 0.3%	3; 0.5%	31; 5.2%

^a Clone reactivity was evaluated by secretion of IFN- γ in response to coculture with target cells pulsed with tumor peptides.

Tableau 1 :

Les 192 clones de chaque patient ont été testés pour leur réactivité contre les différents peptides. Sont indiqués le nombre de clones positifs ainsi que le pourcentage correspondant.

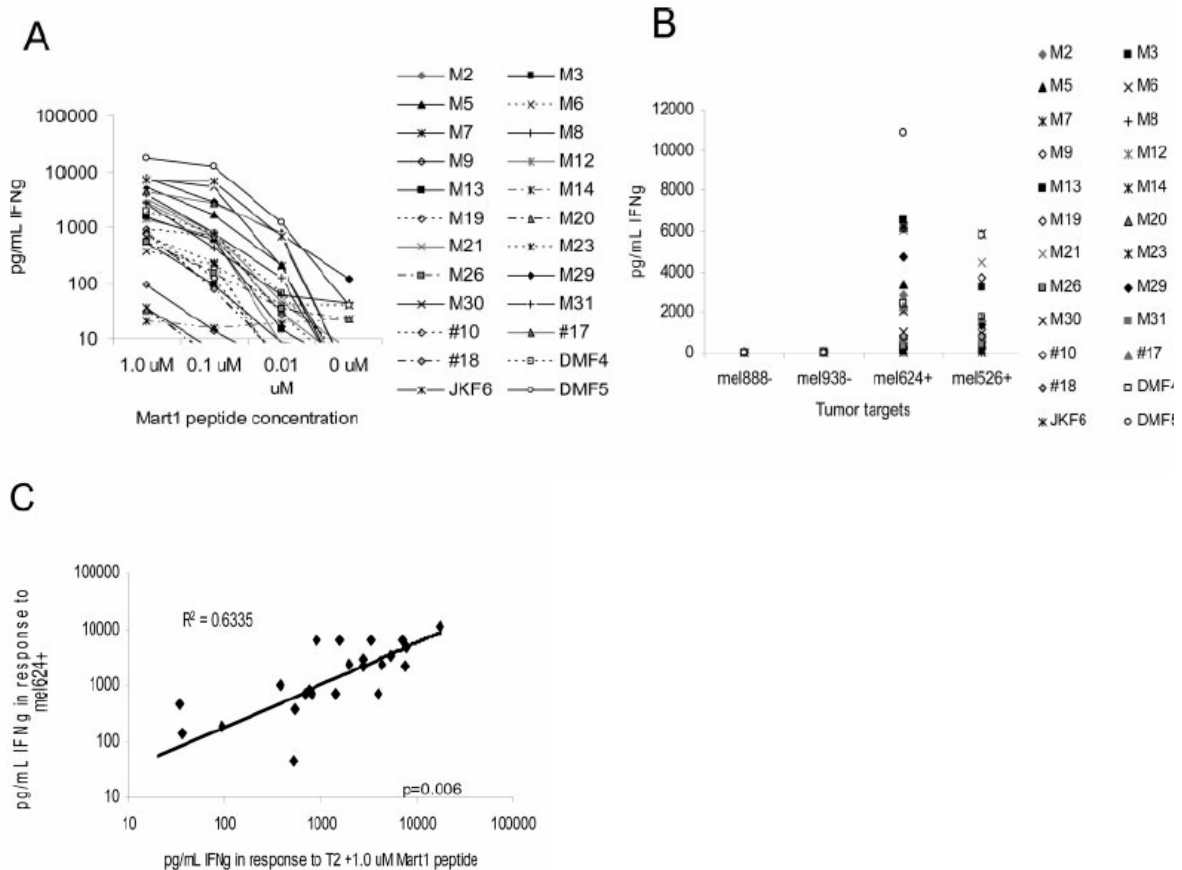


Figure 1.

- Production d'IFN γ des 24 clones sélectionnés après co-culture avec les cellules T2 chargées avec différentes concentrations de peptide MART-1.
- Production d'IFN γ des clones après co-culture avec les cellules de mélanome HLA-A2+ (mel526+, mel624+) ou HLA-A2- (mel888-, mel938-).
- Représentation bivariée de la réponse IFN γ pour différents clones après co-culture avec les cellules T2 + 1uM peptide MART-1 (abscisse) ou les cellules mel624+ (ordonnée).

- D'après le tableau 1, discutez la fréquence de TIL spécifiques de MART-1.
- D'après la Figure 1A, identifiez les clones présentant la plus grande avidité pour MART-1.
- Quelle réactivité présentent les clones les plus affins contre les tumeurs ?
- Quelles conclusions tirez-vous de l'ensemble de ces résultats pour le développement de la stratégie thérapeutique.

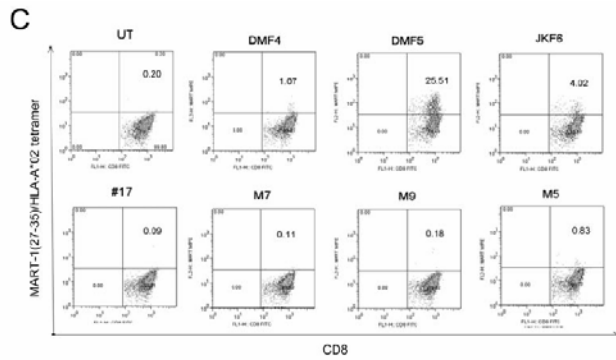


Figure 2

Evaluation par cytométrie de flux des lymphocytes CD8+ du donneur électroporés avec 2ug/10*6 cellules d'ARN TCR-a et TCR-b isolés à partir des différents clones ; après marquage du CD8 et incubation avec le tétramère MART-1 :26-35/HLA-A2. UT=untreated cells.

Après séquençage des chaînes alpha (TRC-a) et beta (TCR-b) du TCR des clones pré-sélectionnés (DMF4, DMF5, JKf6, ...), l'ARN correspondant a été électroporé dans des lymphocytes humains pré-activés et enrichis en CD8+. L'efficacité de transfection a pu être évaluée par co-transfection de la GFP et atteint plus de 95%. Suite au transfert de gène, les lymphocytes sont incubés en présence du tétramère HLA-A2 chargé avec le peptide MART-1 :26-35 et analysés en cytométrie de flux après marquage du CD8 (Figure 2). Des lymphocytes contrôles non transfectés sont représentés (UT).

7. Le transfert d'ARN permet-il de modifier la spécificité des lymphocytes du donneur ?
8. Expliquez la variabilité du pourcentage de cellules capables de fixer le tétramère MART-1 :26-35/HLA-A2 ?

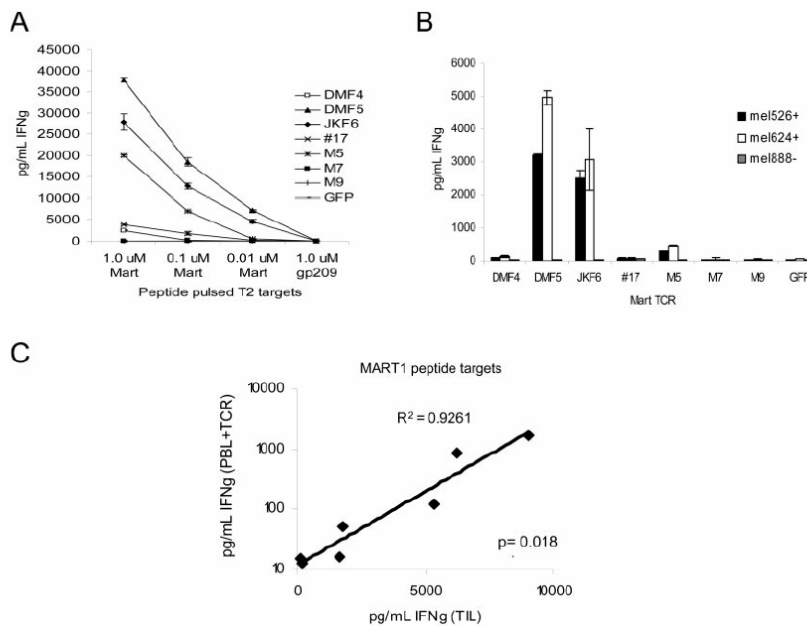


Figure 3

Electroporation de l'ARN du TCR anti-MART-1 isolé à partir de différents clones.

(A-B) Suite à l'électroporation, les lymphocytes CD8+ sont cultivés pendant 16h (A) en présence des cellules T2 chargées avec des concentrations décroissantes de peptide ou (B) en présence des cellules de mélanome HLA-A2+ (mel526+, mel624+) ou HLA-A2- (mel888-).

(C) Comparaison de la réponse IFN-gamma des lymphocytes CD8+ transfectés avec celle des clones TIL natifs qui portent le même TCR. R^2 , coefficient de corrélation.

La réponse antigène-spécifique des lymphocytes CD8+ transfectés a pu être évaluée comme précédemment par co-culture avec les cellules T2 chargées avec des quantités décroissantes de peptide MART-1 ou par co-culture avec une lignée tumorale et comparée avec celle des TIL (Figure 3).

9. Décrivez méthodiquement et interprétez la Figure 3.

Les expériences d'électroporation ont été répétées à partir de lymphocytes du donneur triés sur la base du CD8+ ou CD4+. La réponse IFN γ après restimulation avec l'antigène est représentée dans la Figure 4.

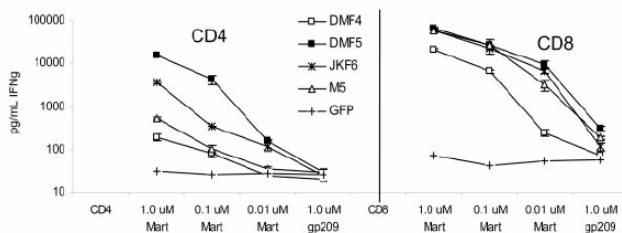


Figure 4.

Les lymphocytes CD4+ (gauche) ou CD8+ (droite) du donneur ont été isolés et électroporés avec l'ARN du TCR dérivé des différents clones, puis testés pour leur fonctionnalité après restimulation par les cellules T2 chargées avec différentes concentrations de peptide MART-1.

10. Décrivez la réactivité des lymphocytes T CD4+ génétiquement modifiés.

11. Indiquez les différentes molécules impliquées dans la reconnaissance antigénique des lymphocytes T CD4+ électroporés.

12. Quel est l'intérêt, dans les stratégies cliniques, d'utiliser de tels lymphocytes T CD4+ génétiquement modifiés et spécifiques de MART-1 ?

Une des optimisations proposées porte sur la modification du TCR cloné. Prenant garde de conserver la partie variable du TCR, les auteurs ont remplacé la partie transmembranaire des régions constantes des chaînes TCR-a et TCR-b par les séquences analogues d'origine murine (mTCR). Après électroporation, les lymphocytes sont testés pour leur capacité à fixer le tétramère MART-1 :26-35 /HLA-A2 (Figure 5).

13. D'après la Figure 5, quelles sont les conséquences des modifications des séquences transmembranaires des chaînes du TCR ?

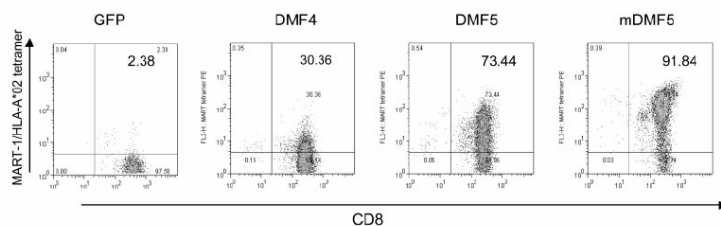


Figure 5. Test de fixation au tétramère. Les lymphocytes T CD8+ du donneur ont été électroporés ou non (GFP) par les TCR DMF4, DMF5 ou DMF5 modifié (mDMF5) pour lequel la partie constante du TCR a été remplacée par la région constante d'origine murine, puis marqués par le tétramère MART-1 :26-35 /HLA-A2.

Cette stratégie est aujourd'hui testée en clinique en utilisant des constructions rétrovirales portant les séquences codant les chaînes a et b du TCR spécifique de MART-1.

Le transfert efficace des lymphocytes génétiquement modifiés réclame un conditionnement lympho-déplétant du patient (cyclophosphamide + fludarabine) et un traitement à l'IL-2. Cette nécessité a pu être mise en évidence, par la même équipe (Dudley, Science 2002), lors d'une ancienne étude d'immunothérapie qui consistait à injecter des TIL isolés et amplifiés in vitro.

Cependant, suite à ce protocole, des altérations importantes ont pu être observées (Figure 6), comprenant notamment (résultats non-montrés) un vitiligo (dépigmentation locale de la peau) et des infections opportunistes (virus RSV).

14. Décrivez la figure 6, proposez une explication à la survenue
 - a. du vitiligo
 - b. des infections opportunistes
 et soulignez la limite de cette stratégie.
15. Quelles modifications apporteriez-vous au protocole utilisé pour limiter ces effets secondaires.
16. Quelles autres stratégies pourraient être également associées pour augmenter la fréquence de patients répondeurs ainsi que le niveau de la réponse anti-tumorale ?

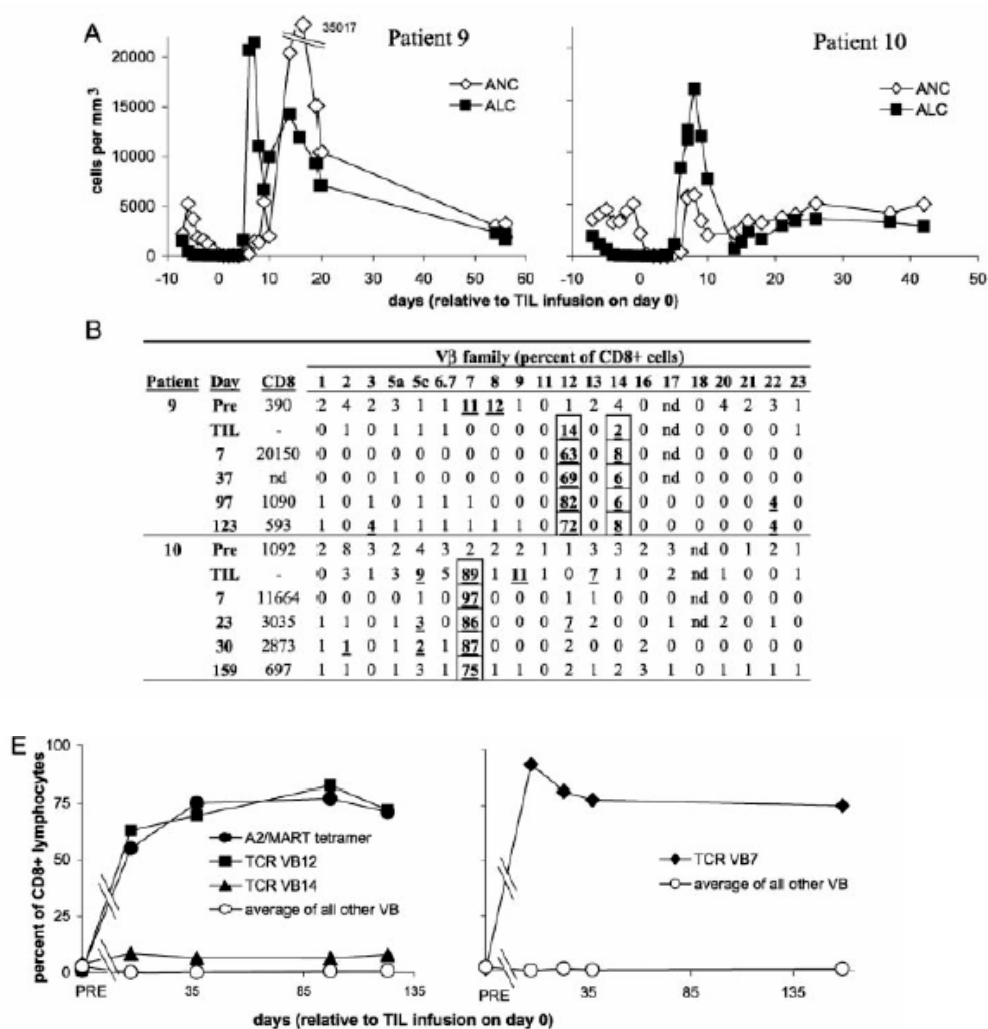


Figure 6

- (A) Représentation du nombre de lymphocytes (ALC) et de neutrophiles (ANC) dans le sang des patients 9 et 10 suite au traitement lympho-déplétant (initié à J-7) et à l'injection des TIL (Jour 0). La valeur normale maximale pour l'ALC est de 4800 cellules/mm³ sang.
- (B) Analyse du répertoire V- β par cytométrie de flux chez les patients 9 et 10 7, 37, 97 et 123 jours après le transfert des TIL. Les résultats sont indiqués en pourcentage par rapport aux CD8+. La colonne CD8 correspond au nombre de CD8/mm³ de sang. Pre, Pré-traitement ; nd, not done.
- (E) Suivi à long-terme des clones dans le sang des patients 9 (gauche) ou 10 (droite) par marquage des TCR-V β ou par tétramère.