

**Cibles et mécanismes d'action des thérapeutiques cellulaires
visant à moduler le système immunitaire**

*Pierre Tiberghien, Olivier Adotevi, François Lemoine,
Jean François Moreau, Salima Hacein-Bey*

I. Introduction	2
II. Contrôle de la réponse immunitaire	2
II-1. Contrôle de la réaction du greffon contre l'hôte	2
II-2. Contrôle des pathologies auto-immunes	3
III. Stimulation du système immunitaire	3
III-1. Induction de réponses immunitaires dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques	3
.....	Erreur ! Signet non défini.
Cellules Natural killer	7
Cellules dendritiques : vaccins	5
III-2. Induction de réponses immunitaires anti-infectieuses	7
CTL Ag spécifique	Erreur ! Signet non défini.

I. Introduction

Deux cas de figure se présentent en pathologie au cours desquels l'initiation d'un traitement à base de cellules humaines pourrait permettre une approche efficace. Il s'agit d'une part des circonstances d'activation anormale du système immunitaire comme les maladies auto-immunes ou l'alloréactivité dans les suites des greffes et transplantations. Ceci concerne d'autre part des pathologies au cours desquelles il est souhaitable de stimuler un système immunitaire déséquilibré comme au cours des cancers, de certaines maladies infectieuses et chez des patients soumis à une immunosuppression.

II. Contrôle de la réponse immunitaire

Si l'utilisation de biothérapies cellulaires constitue un espoir pour le traitement de pathologies auto-immunes, les connaissances dans ce domaine résultent surtout des nombreux travaux ayant analysé le rôle des lymphocytes T dans le cadre de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. La problématique dans ce contexte est de contrôler la réaction du greffon contre l'hôte tout en assurant une bonne reconstitution immunitaire et, dans le cadre des cancers (hémopathies malignes essentiellement), d'avoir un effet anti-tumoral (réaction du greffon contre la leucémie, GvL). Une bonne partie de ces notions a déjà été abordée dans le chapitre L3.3. Schématiquement, au cours des greffes de cellules hématopoïétiques, il est utile de retirer du greffon les cellules susceptibles de générer des lésions par induction de la réaction du greffon contre l'hôte. Il est également possible d'intervenir plus spécifiquement pour faciliter la reconstitution du système immunitaire, y compris de façon spécifique anti-tumorale ou anti-infectieuse.

II-1. Contrôle de la réaction du greffon contre l'hôte

La déplétion ex vivo en lymphocytes T du greffon hématopoïétique et/ou une immunosuppression (cyclosporine et méthotrexate principalement) après greffe sont les deux méthodes qui ont été utilisées pour essayer de prévenir les effets délétères de la réactivité allogénique après greffe. Bien que très efficace pour prévenir la GvH, la déplétion T ex vivo du greffon est associée à une augmentation du risque de rejet de greffe et de rechute leucémique. En revanche, l'immunosuppression après greffe interfère peu avec la prise du greffon et permet de conserver un effet GvL qui peut être observé même en l'absence de GvH. Malheureusement, cette approche n'est que partiellement efficace pour prévenir la GvH. Une modulation efficace de l'alloréactivité après greffe de cellules souches hématopoïétiques, en fonction du risque de rejet de greffe, de GvH et de rechute leucémique, semble donc s'apparenter à une véritable quadrature du cercle.

Une déplétion spécifique des lymphocytes T alloréactifs présents dans le greffon (utilisation d'une immunotoxine dirigée contre la molécule CD25), l'induction d'un état d'anergie par

blocage de la costimulation (CD28/CD80-CD86) ou l'utilisation de lymphocytes T exprimant un gène suicide, figurent parmi les approches expérimentales en cours d'investigation pour tenter de mieux contrôler cette alloréactivité.

Les lymphocytes T alloréactifs expriment des quantités augmentées de récepteur de l'interleukine 2, dont CD25 constitue la chaîne alpha. Une élimination sélective de ces cellules peut donc être réalisée par l'administration d'un anticorps monoclonal ciblant cette molécule, couplé à une toxine comme la ricine (notion d'immunotoxine).

Par ailleurs, les gènes suicides sont des fragments nucléiques capables de transformer une prodrogue en drogue efficace et cytotoxique pour les cellules infectées ex-vivo par ces gènes inclus dans un vecteur rétroviral. Le gène le plus fréquemment utilisé code pour la thymidine kinase de l'*Herpes simplex virus* de type I, HSV1TK. Cette molécule est capable de transformer le ganciclovir, une drogue habituellement utilisée dans le traitement des infections virales, en un métabolite cytotoxique pour une cellule en division. Cette stratégie est utilisée pour éliminer de façon conditionnelle des lymphocytes T alloréactifs modifiés génétiquement par HSV1TK. Ces cellules, provenant du donneur, sont administrées pour renforcer la reconstitution immunitaire du receveur, mais peuvent ainsi être éliminées sélectivement par la simple administration de ganciclovir, si elles s'engagent dans un processus de GvH.

II-2. Contrôle des pathologies auto-immunes

Les lymphocytes T régulateurs sont physiologiquement importants pour le contrôle de l'auto-immunité (cf. livre L2).

Il est donc séduisant de tenter de les purifier et de les expandre en vue de leur utilisation pour le contrôle de pathologies auto-immunes. Cette stratégie s'est avérée efficace dans divers modèles expérimentaux, encourageant leur utilisation en clinique humaine.

Cette stratégie n'est pas encore très développée, mais des essais cliniques ont été développés dans les pathologies auto-immunes à composante inflammatoire chronique. Elles utilisent des lymphocytes régulateurs de type Tr1 amplifiées ex vivo et injectées aux patients.

Par ailleurs, d'autres essais envisagent l'utilisation de lymphocytes Tregs naturels polyclonaux ou spécifiques d'auto-antigène.

III. Stimulation du système immunitaire

III-1. Induction de réponses immunitaires dans les greffes de cellules souches hématopoïétiques

Un grand nombre de données suggère que les lymphocytes T présents dans le greffon de cellules souches hématopoïétiques jouent un rôle important dans l'éradication des cellules

tumorales après greffe. Ces données incluent des études expérimentales, l'observation d'un taux de rechute 2 à 3 fois plus important après greffe hématopoïétique déplétée en lymphocytes T et, surtout, l'efficacité dans certaines hémopathies malignes de l'administration de lymphocytes T du donneur (DLI ou *donor lymphocyte infusion*) dans le contexte d'une rechute, à distance d'une greffe hématopoïétique. Il est important de souligner que, même si la survenue d'une GvH aiguë et/ou chronique est associée à un effet GvL, un effet alloréactif antitumoral peut être observé en l'absence de GvH. Ces observations suggèrent que, malgré des antigènes cibles et des cellules effectrices similaires, la GvH et la GvL peuvent être au moins partiellement dissociées sur un plan clinique. Cela a été notamment mis en évidence dans le contexte de DLI où la dose de lymphocytes T administrée et le délai entre la greffe et la DLI apparaissent comme des variables importantes.

Certaines études ont pu établir que les lymphocytes NK du donneur, qui émergent après la prise de greffe dans un contexte d'incompatibilité donneur anti-receveur pour les récepteurs KIR (*killer cell immunoglobuline like receptors*), peuvent médier un effet antitumoral alloréactif très important (initialement montré dans les leucémies myéloïdes) et favoriser la prise de greffe tout en prévenant la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte. On peut donc envisager que l'administration de cellules NK pourrait contribuer à l'éradication de la maladie résiduelle leucémique chez le receveur.

Par ailleurs, il existe des cellules régulatrices (Tregs), CD4+/CD25+, dans un greffon hématopoïétique. Ces cellules, dont on connaît le rôle important dans la prévention des maladies auto-immunes ainsi que dans l'induction d'une tolérance après greffe d'organe, peuvent également moduler l'alloréactivité après greffe hématopoïétique. Dans des modèles expérimentaux, une déplétion des lymphocytes CD4+/CD25+ dans le greffon accroît en effet l'incidence et la sévérité de la GvH mais également de l'effet antitumoral. Il est ainsi proposé pour certains patients de stimuler cette réponse à distance de la greffe et notamment en cas de rechute, par injection de DLI déplétés en Tregs.

A l'inverse, l'addition de telles cellules lors de la greffe peut retarder ou prévenir de façon significative la survenue d'une GvH délétère. En clinique, l'injection de Tregs permet effectivement de contrôler la GvH.

Une autre population cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses, présentent un potentiel immunosuppresseur majeur. Leur utilisation en transplantation constitue une autre possibilité de contrôle de la GvH.

Enfin, la quantité et la nature des cellules dendritiques présentes dans le greffon peuvent également influencer sur la réactivité allogénique après greffe. Chez le receveur, les cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques jouent un rôle important à la fois pour l'induction et les phases effectrices de cette alloréactivité délétère (la GvH) ou

bénéfique (la GvL). La présentation d'allo-peptides par les cellules présentatrices d'antigène de l'hôte n'est probablement pas suffisante en soi pour induire une réponse allo-immune. Les signaux de danger induits par la toxicité du conditionnement, les traitements antérieurs du receveur ainsi que le contexte viral et autres messagers inflammatoires jouent un rôle important en activant les cellules présentatrices d'antigène professionnelles de l'hôte et probablement des cellules présentatrices d'antigène non professionnelles telles que les cellules endothéliales. Ces signaux de danger peuvent être d'origine endogène (ADN, ARN, protéines du choc thermique telles que Hsp70, interféron α , CD40-ligand,...) ou d'origine exogène (lipopolysaccharides, lipoprotéines bactériennes, ADN dont les séquences CpG,...). Cette activation accroît la stimulation des monocytes et des macrophages et la production de cytokines inflammatoires. Ces cytokines inflammatoires, en synergie avec des effecteurs cellulaires tels que les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK sont responsables d'une augmentation des lésions tissulaires. La modulation ex-vivo ou l'administration de cellules dendritiques constituent ainsi d'autres voies de biothérapie cellulaire à explorer.

III-2. Induction de réponses immunitaires anti-tumorales

III-2-a.Cellules dendritiques : vaccins

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces du système immunitaire. L'efficacité des cellules dendritiques repose sur leur pouvoir d'activation et de prolifération à la fois des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes T CD4 auxiliaires et sur leur capacité de migration des tissus périphériques, où elles rencontrent l'antigène vers les organes lymphoïdes, où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. L'utilisation de ces cellules dans des essais cliniques a été possible grâce au développement de techniques permettant de les produire en grand nombre à partir de monocytes dérivés du sang ou de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ en utilisant des cytokines telles que le GM-CSF et l'IL-4. Les cellules dendritiques sont chargées *in vitro* avec un antigène viral ou tumoral, le plus souvent sous forme de peptides capables de se fixer sur les molécules du CMH. Puis ces cellules sont ré-injectées par voie sous cutanée ou intradermique. Elles sont alors d'excellentes cellules activatrices des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du peptide présent sur la cellule cible infectée ou tumorale.

Les résultats des essais cliniques ont montré l'induction de réponses immunitaires fréquente mais de faible intensité. Par ailleurs on a constaté que les cellules dendritiques injectées ont des capacités insuffisantes de migration. En résumé, c'est une stratégie dont l'efficacité est réelle mais limitée. Les protocoles cliniques doivent donc être améliorés.

III-2-b.Thérapie cellulaire par transfert adoptif de lymphocytes spécifiques de tumeurs

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans la régulation de la croissance tumorale. Une corrélation a été établie entre la réponse immunitaire antitumorale et la capacité à contrôler voire à éliminer le cancer chez certains patients. Ainsi, l'immunothérapie anti-tumorale permet de moduler le microenvironnement tumoral en stimulant les cellules du système immunitaire pour éliminer spécifiquement la tumeur. De nombreuses approches sont aujourd'hui disponibles telles que les vaccins et le transfert de cellules immunitaires effectrices, appelé transfert cellulaire adoptif (Adoptive Cell Transfer : ACT). On distingue trois principales approches : le transfert de lymphocytes infiltrant la tumeur (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL), le transfert de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux et l'utilisation de cellules NK.

- Transfert adoptif de TIL

Les lymphocytes T infiltrant la tumeur sont des lymphocytes T CD8 ou CD4 présents dans la tumeur autologue. Ils ont été décrits dans plusieurs cancers et la présence d'un taux élevé de TIL/CD8 ou TIL/Th1 est un facteur de bon pronostic. Ces lymphocytes sont isolés de la tumeur après dissociation mécanique ou enzymatique suivie d'une amplification *in vitro* en présence de cytokines telles que l'IL-2 avant leur injection par voie intraveineuse chez le patient. Cette méthode est majoritairement développée dans le mélanome et l'analyse rétrospective de plusieurs essais cliniques a montré une efficacité en terme de survie. Des réponses cliniques ont été obtenues également après administration de TIL associés à de l'IL-2. Une corrélation a été retrouvée entre la capacité des T CD8 présents dans les TIL à lyser la tumeur autologue et les régressions tumorales. L'avantage de l'utilisation des TIL pour une immunothérapie adoptive est qu'elle ne nécessite pas l'identification des antigènes reconnus par les lymphocytes T. En revanche la part de lymphocytes réactifs à la tumeur au sein de ces TIL réinjectés est variable et leurs fonctions anti-tumorales ne sont pas clairement caractérisées.

- Transfert de lymphocytes T spécifiques d'antigènes de tumeurs

Les essais actuels s'orientent vers l'administration de clones T CD8 cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. L'identification de nombreux antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T a permis le développement de stratégies de transfert adoptif. Pour obtenir ces lymphocytes, plusieurs étapes *in vitro* sont nécessaires : stimulation, clonage et amplification. Un inconvénient majeur de cette stratégie est qu'elle peut provoquer la perte de l'expression de l'antigène ciblé par les cellules tumorales par pression sélective. Un autre facteur limitant réside dans la nécessité de réaliser plusieurs étapes de sélection et d'amplification *in vitro* pour obtenir une grande quantité de lymphocytes T fortement réactifs

à la tumeur, ce qui conduit à l'utilisation de cellules fortement différenciées, ayant une durée de vie limitée après transfert *in vivo*.

De récents progrès ont été réalisés pour dépasser ces limites. Ainsi les lymphocytes T peuvent être génétiquement modifiés pour exprimer soit un TCR de forte affinité et spécifique d'un antigène tumoral (TCR transgénique), soit un récepteur chimérique utilisant la spécificité d'un anticorps et les voies de signalisation intracellulaire d'un complexe TCR (chimeric antigen receptor ou CAR). Un avantage de cette approche est qu'elle permet de transférer aux patients des lymphocytes moins différenciés et donc avec un meilleur potentiel de survie *in vivo*. Cette voie très prometteuse est applicable à de nombreux cancers, la seule limite reste l'identification d'antigènes immunogènes.

Les résultats cliniques obtenus par transfert adoptif de lymphocytes antitumoraux se sont nettement améliorés cette dernière décennie grâce au conditionnement « lymphoablatif » préalable du receveur. Ce conditionnement est obtenu par chimiothérapie ou irradiation corporelle totale. Il induit chez le receveur une leuco-lymphopénie permettant une meilleure expansion des lymphocytes T injectés. De plus, ce conditionnement peut éliminer les cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes Tregs et les cellules myéloïdes suppressives.

Transfert de cellules NK

Les données émanant des allogreffes de cellules hématopoïétiques haplo-identiques dans les hémopathies malignes ont démontré que la présence d'une alloréactivité des cellules NK (incompatibilité donneur et receveur pour les récepteurs KIR), était associée à une meilleure survie des patients. En effet, les fonctions cytotoxiques des NK du donneur ne sont pas inhibées par les ligands de KIR exprimés sur les cellules du receveur. Des essais sont actuellement en cours pour étendre cette stratégie aux traitements des tumeurs solides. Il s'agit d'injecter des cellules NK allogéniques provenant du sang de volontaires sains sur la base d'une incompatibilité des ligands de KIR entre donneur et receveur. L'isolement et la purification de cellules NK reposent sur des procédures de tri cellulaire, à partir de cellules mononucléées du sang. Les lymphocytes NK sont activés *in vitro* avant injection aux patients par de l'IL-2 à forte concentration. Un conditionnement préalable induisant une lymphopénie transitoire au transfert adoptif de cellules NK, favorise leur survie et leur prolifération chez le receveur.

III-2. Induction de réponses immunitaires anti-infectieuses : exemple de transfert adoptif de lymphocytes T anti-EBV

L'administration de lymphocytes T spécifiques d'antigènes viraux peut être utilisée pour contrôler certains syndromes lymphoprolifératifs viro-induits tels que ceux associés au virus

d'Epstein Barr (EBV). L'EBV est un herpès virus humain lymphotrope B, ubiquitaire, infectant 95 % de la population mondiale.

Chez le sujet sain, la réponse immunitaire contre le virus EBV est dirigée à la fois contre les protéines du cycle lytique et contre celles de la latence virale, lors de la primo-infection et au cours de l'infection persistante.

L'infection par le virus EBV stimule des réponses immunitaires à la fois humorales et cellulaires. Bien que la présence d'anticorps soit importante pour établir le diagnostic, le contrôle de l'infection virale est principalement assuré par l'induction d'une réponse cellulaire T spécifique. Celle-ci permet de contrôler la réplication virale et la prolifération des lymphocytes B immortalisés et transformés par l'EBV. Dans certaines situations d'immunosuppression cellulaire (patients transplantés et/ou traités par immunosuppresseurs), l'absence de réponse immunitaire T peut favoriser le développement d'une lymphoprolifération B associée à l'EBV.

Cette hypothèse a été en partie vérifiée in vivo par les protocoles de thérapie cellulaire réalisés après greffe de moelle. L'injection de lymphocytes T cytotoxiques du donneur, spécifiquement dirigés contre l'EBV, induit, chez les patients immunodéprimés, la régression de lymphomes B associés à l'EBV. Ces régressions tumorales sont par ailleurs accompagnées d'une diminution de la charge virale EBV dans le sang circulant.

D'autres études ont montré que chez des sujets à risque de lymphoprolifération B associée à l'EBV (greffe de moelle), le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV peut être utilisé comme thérapeutique préventive. Ces résultats montrent le bénéfice thérapeutique des lymphocytes T cytotoxiques du donneur dans la prise en charge des tumeurs liées à l'EBV.

Dans les transplantations d'organe solide, l'immunosuppression iatrogène provoque un déficit profond de l'immunité à médiation cellulaire qui expose le receveur au risque de développer une lymphoprolifération associée à l'EBV. Dans ce cas, il est nécessaire d'amplifier la réponse cytotoxique à partir des lymphocytes T CD8 du receveur et non du donneur. Le traitement d'un patient transplanté par ces lymphocytes participe à la reconstitution de l'immunité spécifique de l'EBV.

Les méthodes de production de lymphocytes T anti-EBV sont identiques à celles précédemment décrites pour les lymphocytes T spécifiques de tumeur. Il faut néanmoins noter que grâce à un diagnostic précoce des lymphoproliférations EBV post-transplantation, autorisé par la mesure et le suivi régulier de la charge virale EBV dans le sang circulant, et surtout grâce à l'efficacité spectaculaire des anticorps monoclonaux anti-lymphocytes B (rituximab), les situations justifiant le recours au transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'EBV sont devenues aujourd'hui exceptionnelles.

A retenir

- Les biothérapies cellulaires ont des applications potentielles en auto-immunité, dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques et en thérapeutique anti-tumorale
- Le contrôle de l'alloréactivité au cours des greffes de cellules souches hématopoïétiques utilise de nombreuses stratégies visant essentiellement à moduler l'action des lymphocytes T allo-réactifs du greffon
- Les espoirs d'utilisation des biothérapies cellulaires en auto-immunité impliquent une manipulation des Tregs
- Les greffons de cellules souches hématopoïétiques peuvent contenir des cellules à potentiel anti-leucémique
- Certains protocoles cliniques envisagent d'utiliser les cellules dendritiques comme initiateurs de réponses anti-tumorales
- Les biothérapies cellulaires anti-tumorales peuvent utiliser des lymphocytes infiltrant la tumeur, des lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux ou des cellules NK
- Les biothérapies cellulaires peuvent aussi contribuer à restaurer le potentiel immunitaire anti-infectieux

Schéma récapitulatif des principes de l'immunothérapie cellulaire.

