

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

ANNEE 2000 – THESE N° 85

Etude d'un modèle de présentation peptidique via le CMH de classe I en vue de vaccination anti-tumorale : utilisation de peptides fusionnés au fragment B de la toxine de *Shigella*.

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD – LYON I

(Médecine – Pharmacie)

et soutenue publiquement le 17 Novembre 2000

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Bosset Sophie

née le 20 Avril 1972

à Besançon (Doubs)

COMPOSITION DU JURY

Pr. Jean-François NICOLAS

Dr. Delphine GREZEL

Pr. Jean-Pierre MAGNOL

Dr. Patrick DEVAUCHELLE

Président

Premier Assesseur

Deuxième Assesseur

Invité

DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉINAIRE DE LYON

Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 1^{er} sept 2000

DEPARTEMENT	PREX	PRI	PR2	MC	MA ancien statut	Contractuel, associé & IPAC	AERC	Chargés de conseil et d'enseignement
DEPART. SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Gt.		Y RICHARD M PRAVE C CHAUVÉ G. CHANTEGRELET	G BOURDOISEAU P. DEMONT A. LACHERETZ	A. KODJO 80 % D. GREZEL 80 % V. GUERIN J. VIALARD L. ZENNER C. VENOZNY A. GONTHIER		M. ARTOIS PR associé	M. P. CALLAIT	
DEPART. DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Anatomie Chirurgie et Anesthésiologie Dermatologie - Cancérologie Médecine interne Imagerie médicale		E. CHATELAIN J.P. GIBNEVOIS J.F. MAGNOL	T. ROGER D. FAU C. FOURNEL	M.A. BERTHELET S. SAWAYA E. TRONCY T. MARCHAL L. CHABANNE P. BARTHÉZ	D. BÉMY	WATRELOT-VIREUX MC 0,5 PERRON-LEPAGE MC 0,5	C. CAROZZO F. PONCE C. ESCRIOU	M. WITZ
DEPART. DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootéchnie, Éthologie & Économie animale Nutrition et Alimentation Biol. & Patho. de la Reproduction Patho. Animales de Production		M. FRANCK J.P. DESCHANEL J.F. BARDINAUD P. BEZILLE	M. RACHAIL T. ALOGNINOUWA	D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. BORDON P. GUERIN R. FRIKHA M.A. ARCAINGIOLI D. LE GRAND		A. DERNBURG MC contractuel N. GIRAUD MC contractuel D. LAURENT MC associé 0,2 P. DEBARNOT MC contrac. 0,2 G. LESENECAL MC contrac. 0,2		T. OSSET
DEPART. SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie / Réceptologie Biophysique / Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacie / Toxicologie / Législation de Médecament Bio-Mathématiques Langues	P. DELATOUR G. LONGUE	R. BORVIN P. GARNIER	B. BENOIT F. GRAIN P. JAUSSAUD G. KECK	J.J. THÉBAULT T. BURONFOSSÉ V. LAMBERT P. BÉNY P. SABATIER M.L. DELJONNETTE 80 % K. CHALVET-MONFRAY	J.M. BONNET-GARIN			
DEPART. HISTOIRE Pathologie équine Chirurgie équine Expertise microscopique		O. LEPAGE	J.L. CADORÉ C. FLEURY	S. MARTINOT	A. LEBLOND	M. BOCQUET A. FAVIER A. BENAMOU		

REMERCIEMENTS

J'adresse mes premiers remerciements à Monsieur Jean-François Nicolas de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de me faire l'honneur de présider ce jury.

J'aimerais remercier Madame Delphine Grézel de m'avoir accordée sa confiance, son aide dans la finalisation de ce travail et d'avoir évalué ce mémoire avec une grande rigueur scientifique.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Pierre Magnol d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur Patrick Devauchelle de sa présence dans ce jury et de m'avoir orienté vers la voie de la recherche, ses encouragements tout au long de mes études vétérinaires m'ont permis de découvrir ce métier d' "explorateur".

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de recherche de l'unité INSERM 255, je remercie Monsieur Hervé Fridman de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie également Monsieur Eric Tartour de m'avoir encadrée tout au long de cette étude.

Je remercie tous les membres de son équipe et du laboratoire pour leur aide et leur soutien et plus particulièrement Nacilla Haïcheur pour l'enseignement des techniques de culture cellulaire, indispensables à la réalisation de ce projet.

A toute ma famille, passée, présente et à venir,
A Margaux,

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	3
LABORATOIRE	4
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	6
INTRODUCTION	7
PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE	9
<i>Rôle des lymphocytes T cytotoxiques dans le développement d'une immunité anti-tumorale</i>	9
<i>Les différentes méthodes visant à transloquer les protéines exogènes dans le cytosol</i>	17
<i>Utilisation du fragment B de Shigella dysenteriae comme outil de vaccination anti-tumorale</i>	20
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	22
<i>Matériel et Méthodes</i>	22
<i>Résultats</i>	28
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION	44
<i>Mécanismes à l'origine du ciblage de peptides exogènes par le fragment B de la toxine de Shiga vers une voie de présentation CMH I restreinte</i>	44
<i>Cellules présentant des peptides dérivés de protéines exogènes par des molécules du CMH I</i>	46
<i>Induction de lymphocytes T cytotoxiques après vaccination par le fragment B fusionné à un peptide antigénique</i>	47
CONCLUSION	49
BIBLIOGRAPHIE	50

LABORATOIRE

Intitulé :

Unité d'immunologie cellulaire et clinique
Inserm U 255
Institut Curie
Paris

Equipe :

Chercheurs : Wolf-Herman FRIDMAN, Professeur des Universités, PH
Eric TARTOUR, Médecin spécialiste en immunologie,
Curie

Post-Doc : Nacilla HAICHEUR, Curie

PRINCIPALES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag : Antigène
ARN : Acide ribonucléique
CD : " Cluster of Differentiation "
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL : Lymphocyte T Cytotoxique
DO : Densité Optique
EBV : Virus d'Epstein-Barr
GM-CSF : " Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor "
IFN γ : Interféron γ
IL-12 : Interleukine 12
IL-2 : Interleukine 2
PPMP : 1-phenyl-2-hexadécanoylamino-3-morpholino-1-propanol
RE : Réticulum Endoplasmique
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
TAP : " Transporter Associated with antigen Processing "
TCR : " T Cell Receptor "
TIL : Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Expression du récepteur Gb3 pour le fragment B de la toxine de Shiga et de l'allèle Kb du CMH I à la surface de différents types cellulaires.

Figure 2. Reconnaissance par un hybridome T spécifique du peptide SL8 dérivé de l'ovalbumine et restreint par l'allèle Kb du CMH I après sensibilisation de différents types cellulaires avec la protéine de fusion Shiga-SL8.

Figure 3. Rôle de l'internalisation dans la présentation CMH I restreinte du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de la toxine de Shiga.

Figure 4. Comparaison de l'efficacité de présentation du peptide SL8 par les cellules dendritiques D1 (fixées ou non) après une sensibilisation des cellules avec l'ovalbumine ou la protéine de fusion Shiga-SL8.

Figure 5 A. Expression du récepteur Gb3 en présence ou non de PPMP.

Figure 5B. Rôle du récepteur Gb3 dans l'internalisation et le ciblage de la voie de présentation CMH I restreinte de la protéine de fusion Shiga-SL8.

Figure 6. Effet de la lactacystine dans la présentation CMH I restreinte du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de Shiga.

Figure 7 A. Induction d'une réponse CTL in vivo par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par la protéine recombinante Shiga-P1A.

Figure 7 B. Induction d'une réponse CTL in vivo par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par la protéine recombinante Shiga-P1A.

Figure 8. Calcul expérimental de la réponse CTL spécifique de l'antigène P1A par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par le fragment B de Shiga.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Différents arguments épidémiologiques plaident en faveur d'un rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement de tumeurs. Ainsi il a été observé une augmentation de fréquence de certains cancers chez les patients présentant une immunodépression congénitale ou acquise (SIDA, traitement immunosuppresseurs)(1).

L'identification moléculaire au début des années 90 d'antigènes tumoraux a démontré l'immunogénicité potentielle de tumeurs même si le concept de vaccination anti-tumorale date de la fin des années 50. Dans différentes expériences d'immunisation avec des tumeurs irradiées, Foley et Klein montraient qu'une protection contre une greffe tumorale ultérieure pouvait être obtenue. Le groupe de North et d'autres auteurs ont mis par la suite en évidence le rôle majeur de l'immunité de type cellulaire médiée par les lymphocytes T dans le contrôle du développement des tumeurs.

Ainsi les nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie s'attachent à induire après vaccination des lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant des antigènes tumoraux. Cependant, lors de vaccination conventionnelle, et d'une façon générale, l'internalisation des protéines s'effectue dans la voie endosomale ; elles sont dégradées dans les lysosomes, et les peptides issus de la dégradation sont associés aux molécules du CMH de classe II et ne sont pas la cible des lymphocytes T cytotoxiques.

Dans le laboratoire U 255 du Professeur W.H.Fridman dans lequel j'ai effectué mon stage de DEA, le groupe du Docteur E.Tartour a montré lors d'un premier travail qu'un nouvel outil de vectorisation, le fragment B de la toxine de *Shigella dysenteriae*, fusionné à un peptide tumoral permettait le ciblage de ce peptide exogène dans une voie de présentation restreinte par le CMH I.

Dans une première étude, nous avons analysé *in vitro* le mécanisme potentiel par lequel le fragment B de la toxine de *Shigella dysenteriae* permettait de cibler une voie de présentation restreinte par le CMH I. Dans une seconde étude, nous avons cherché à générer *in vivo* des lymphocytes T cytotoxiques contre un peptide vectorisé par le fragment B de la toxine.

La première partie de cette thèse dresse un bilan bibliographique du rôle des lymphocytes T CD8 cytotoxiques dans le contrôle du développement tumoral, expose les méthodes utilisées pour générer ces Lymphocytes T spécifiques d'antigène et présente le fragment B de la toxine de *Shigella* comme nouvel outil de

vectorisation intra-cellulaire des protéines. La deuxième partie de cette thèse décrit et interprète l'étude expérimentale.

Ce travail, repris et complété par l'équipe du Dr Eric Tartour, a été publié dans *The Journal of Immunology*, 2000, 165 : 3301-3308 (publication en annexe).

PREMIERE PARTIE :
BIBLIOGRAPHIE

PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

I. Rôle des lymphocytes T cytotoxiques dans le développement d'une immunité anti-tumorale

I.1. Développement de l'immunité anti-tumorale

I.1.1. Reconnaissance d'une cellule tumorale par le système immunitaire

Au début du siècle un anatomopathologiste, Holmgren, a observé une diminution de fréquence de cancers lors de l'autopsie de patients décédés de tuberculose (1). La stimulation du système immunitaire par le bacille de Koch semblait protéger contre le développement de tumeurs. L'injection de tuberculine chez des patients atteints de cancer reste aujourd'hui un des traitements de référence des tumeurs de la vessie.

A la fin des années 50, Foley et Klein ont démontrés que des souris immunisées avec des cellules tumorales irradiées pouvaient être protégées contre une greffe tumorale ultérieure. Ces tumeurs murines, induites expérimentalement par des substances carcinogènes ou par une irradiation par rayon UV, présentaient une croissance très variée après leur injection à des receveurs syngéniques. La plupart des tumeurs, appelées "tumeurs progressives", avaient une croissance ininterrompue qui pouvait tuer le porteur, mais certaines tumeurs, appelées "tumeurs régressives" pouvaient croître pendant un certain temps et régresser ensuite.

Burnet dans les années 70 a formulé la théorie de l'immunosurveillance : " L'une des fonctions du système immunitaire, principalement des cellules T, est d'éliminer les cellules de l'organisme devenues anormales par des mutations ou transformations néoplasiques, un cancer ne se développant que lorsqu' apparaît un état d'immunodéficience" (2).

Le besoin impérieux de cellules T pour l'élimination des tumeurs régressives ou pour la mise en place d'une immunité contre les tumeurs progressives, indique que ces tumeurs expriment des peptides antigéniques capables d'être reconnus par les cellules T.

1.1.2. Identification d'antigènes tumoraux

La caractérisation moléculaire d'antigènes tumoraux reconnus par des effecteurs immunologiques, a représenté une étape décisive dans l'immunologie des tumeurs. La recherche de ces antigènes, à l'origine du rejet des tumeurs expérimentales, a progressé grâce aux méthodes de clonage des cellules tumorales et des lymphocytes T et à la mise en évidence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales greffées au sein des ganglions des animaux rejetant leur greffe.

A partir de ces stratégies, d'abord mises au point chez la souris pour l'identification d'antigènes tumoraux murins, l'équipe de T.Boon a réussi à cloner le premier antigène tumoral associé à un mélanome humain, appelé Mage 1 (Melanoma antigen) (3). A la suite de ces travaux pionniers, d'autres antigènes tumoraux spécifiques de tumeurs ont été identifiés et classés en différents groupes :

- les antigènes provenant de mutations cytoplasmiques, qui génèrent de nouveaux peptides capables d'être présentés sur des molécules du CMH de classe I à des lymphocytes T CD8,
- les antigènes provenant de changement dans le niveau d'expression des protéines cellulaires normales,
- les antigènes provenant de la réactivation de gènes embryonnaires qui sont exprimés dans la tumeur mais non dans le tissu duquel dérive la tumeur,
- les antigènes viraux, lorsqu'un virus est associé au développement d'une tumeur (tel que l'EBV dans le lymphome de Burkitt ou les cancers du nasopharynx, le virus de l'hépatite B dans les cancers du foie ou certains papillomavirus dans les cancers du col), peuvent être la cible d'une réponse immune anti-tumorale.

L'immunogénicité de ces antigènes tumoraux varie selon le degré d'altérité (les antigènes anormaux au niveau d'un tissu, mais exprimés dans un autre tissu, sont peu immunogènes puisque ils sont reconnus comme soi).

1.1.3. Immunité naturelle anti-tumorale

La présence d'auto-anticorps contre des antigènes tumoraux suggère l'existence d'une réponse physiologique de l'organisme au développement tumoral (présence d'anticorps dirigés contre des gangliosides (surexprimés dans les mélanomes, ou les neuroblastomes) dans le sérum de certains patients) (4).

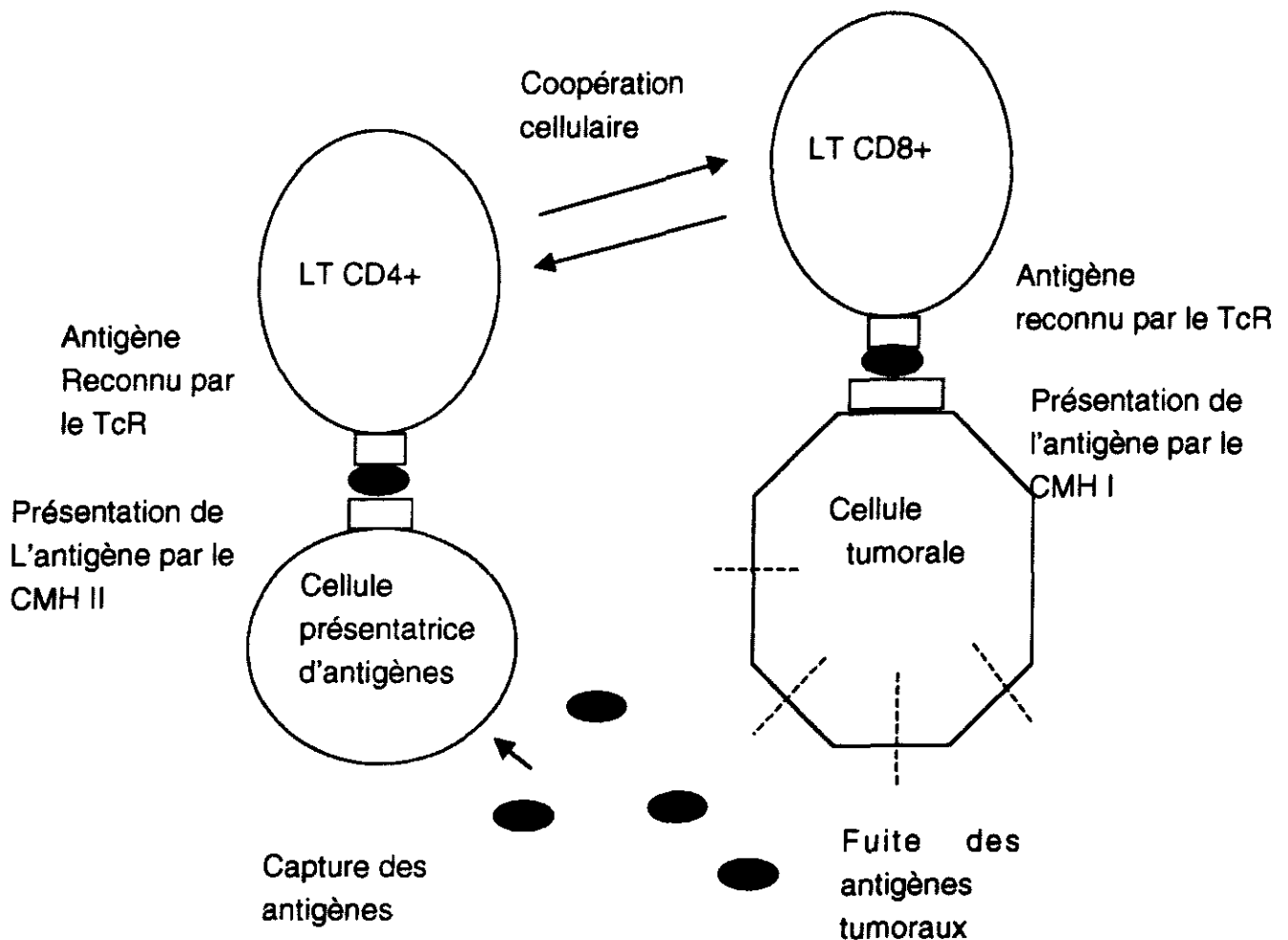
Trois types de cellules participent à cette immunité naturelle anti-tumorale :

- Les lymphocytes NK (Natural Killer) sont susceptibles de lyser *in vitro* des lignées tumorales ayant une expression faible ou nulle de molécules du CMH.
- Les macrophages activés *in vitro* par des cytokines (IFN γ) et des produits d'origine bactérienne (LPS) sont susceptibles de lyser *in vitro* des cellules tumorales. Dans différents modèles expérimentaux de tumeurs transplantables, l'activation des macrophages par des molécules d'origine bactérienne (lipopolysaccharides, peptidoglycanes, lipopetides) a pu entraîner une régression tumorale.
- Les éosinophiles activés par l'IL5 et différents médiateurs ont une puissante activité cytotoxique qui peut s'étendre aux cellules tumorales.

1.1.4. Réponse immunitaire spécifique d'antigènes tumoraux

Réponse immunitaire spécifique

Des expériences conduites sur des souris déficientes en lymphocytes T ont montré que les lymphocytes T étaient nécessaires pour obtenir une régression de la tumeur, et qu'un transfert de lymphocytes T d'une souris immune pouvait conférer une immunité spécifique contre la tumeur aux souris déficientes en cellules T. L'induction de la réponse primaire spécifique nécessite l'activation de lymphocytes T CD4⁺ par des cellules présentatrices d'antigène exprimant des peptides d'antigène tumoraux en association avec des molécules de classe II du CMH. Il peut s'agir de la cellule tumorale elle-même (ex : cancer colo-rectal), ou de cellules dendritiques ou de macrophages qui internalisent par endocytose les antigènes tumoraux libérés par la cellule tumorale.



Développement d'une réponse immune anti-tumorale

L'activation de ces Lymphocytes T CD4+ nécessite un premier signal de reconnaissance du complexe CMH II-Ag par leur TcR, doublé d'un ensemble de cosignaux : le signal de co-stimulation apporté par des molécules membranaires (molécule B7 liée à CD28) et la sécrétion de cytokines. La réponse effectrice cytotoxique spécifique de l'antigène est relayée par les lymphocytes T CD8+ qui nécessitent eux aussi, un signal spécifique et des cosignaux. Le premier signal est la reconnaissance par leur TcR de l'antigène associé à une molécule de classe I du CMH (restriction); la cellule T est alors dite sensibilisée. Le deuxième signal est plus complexe, assuré par différentes cytokines dont l'IL2, qui permet la différenciation et la prolifération des CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques ; les cellules T sont alors dites effectrices. Les lymphocytes T cytotoxiques produisent des cytokines qui vont agir sur différentes catégories cellulaires et assurer l'amplification de la réponse.

Ces phénomènes aboutissent au développement d'une réponse immune spécifique, efficace, avec apparition de cellules T mémoires qui vont assurer la

persistance de la réponse, même après disparition de l'antigène causal. Ce phénomène de mémoire est très important car il fonde l'espoir de pouvoir protéger le patient contre la réapparition de la tumeur.

Rôle des lymphocytes T CD8+

Le rôle des lymphocytes T-CD8 cytotoxiques (CTL) dans l'inhibition du développement tumoral a été démontré par différents travaux. Chez la souris, il existe le plus souvent une corrélation entre la capacité à induire des CTL anti-tumoraux et une réponse clinique anti-tumorale (5).

Chez l'homme, et chez la souris, le groupe de Rosenberg a montré que l'administration de lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) cultivés *in vitro* avec de l'IL-2 puis réinjectés *in vivo* entraînait des réponses cliniques anti-tumorales (6). Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques vis à vis de la tumeur semblaient responsables de cette action. Dans un modèle de mélanome régressif, une infiltration massive par des lymphocytes T cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur du patient suggérait que ces effecteurs étaient responsables du rejet naturel de la tumeur (7).

La mise en évidence directe de la capacité de CTL humains à lyser des tumeurs humaines *in vivo*, dérive de l'expérience où des clones T humains cytotoxiques contre un mélanome humain ont été injectés à des souris SCID préalablement greffées avec cette tumeur. Une régression clinique fut alors observée (8). Dans des protocoles de vaccination anti-tumorale, l'obtention de CTL constitue donc l'un des objectifs à atteindre.

1.1.5. Echappement à la réponse immune anti-tumorale

L'absence de réponse immune efficace spontanée contre des cellules cancéreuses exprimant des antigènes tumoraux peut avoir différentes origines :

- influence du volume tumoral : les tumeurs de petite taille ne seraient pas suffisamment immunogènes, et au contraire les tumeurs très volumineuses seraient protégées par la production de molécules immuno-suppressives comme le TGF β .
- surexpression par certaines tumeurs des gènes de résistance à l'apoptose (lymphome de Burkitt groupe III)

En présence d'une réponse T cytotoxique initialement efficace, la tumeur peut échapper par mutations ponctuelles itératives (sélection de mutants et progression vers des stades de malignité plus élevés).

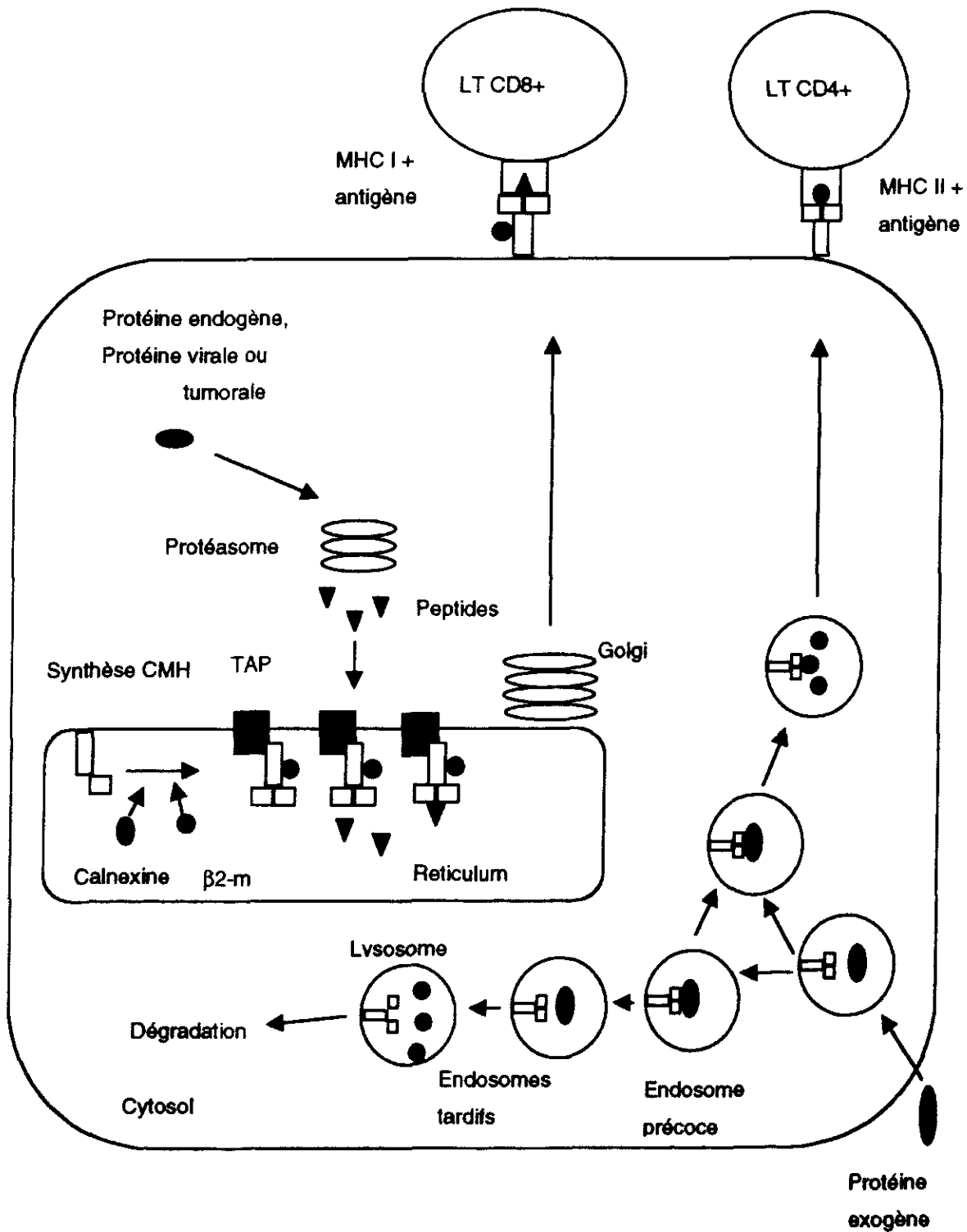
Le développement de la réponse immune peut être bloqué par l'absence de peptides antigéniques présentables par les molécules de classe II du CMH, une présentation

insuffisante des antigènes par les cellules présentatrices, une insuffisance quantitative de cytokines sécrétées par les lymphocytes T.

La fonction effectrice peut aussi être déficiente du fait d'un défaut d'expression de molécules de classe I à la surface de la cellule tumorale, d'un apprêtement (processing) incorrect ou déficient des antigènes tumoraux, conduisant à l'absence ou l'insuffisance de peptides antigéniques présentables.

En résumé, l'évasion immune tumorale peut résulter de nombreux facteurs : absence ou faible immunogénicité des antigènes tumoraux, insuffisance de présentation aux lymphocytes T CD4+ et CD8+, insuffisance des cosignaux intercellulaires. On observe alors des situations où les lymphocytes T sont présents mais inefficaces (tolérance).

I.2. Nature et génération de l'antigène reconnu par les LT CD8 cytotoxiques



Voies de présentation de l'antigène (d'après Rock 1996)(9)

Les LT cytotoxiques CD8 reconnaissent par l'intermédiaire de leur récepteur à l'Ag (TCR), un complexe formé de la molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I) et d'un peptide issu de la dégradation d'une protéine intra-cellulaire (10). La présentation d'un peptide à la surface de la cellule cible passe par trois étapes majeures :

- 1) Activité protéolytique d'un complexe multi-enzymatique cytosolique et nucléaire appelé protéasome
- 2) Translocation des différents peptides issus de cette dégradation dans le réticulum endoplasmique (RE) à l'aide des transporteurs TAP1 et TAP2
- 3) Association des peptides de 9 acides aminés au complexe chaîne lourde du CMH I/ β 2-microglobuline pour former une molécule de CMH I stable exportée à la membrane.

Ainsi, les molécules du CMH de classe I exposent des peptides provenant du cytosol à la membrane cellulaire où le complexe peptide/CMH est reconnu par des cellules T CD8 cytotoxiques. Au contraire, les molécules du CMH de classe II exposent des peptides plus longs (13-25 AA) générés par une dégradation polypeptidique au niveau de la voie endosomale.

Lors de vaccination conventionnelle, les protéines exogènes ou extra-cellulaires sont internalisées par les endosomes, dégradées dans les lysosomes et les peptides issus de cette dégradation s'associent aux molécules du CMH de classe II et ne sont pas la cible des CTL. Ces données expliquent pourquoi dans la majorité des cas la vaccination à l'aide de protéines exogènes est inefficace pour l'induction de CTL *in vivo* (11). De même en dehors de publications anecdotiques, et pour des raisons mal expliquées (dégradation rapide du peptide après son administration, association préférentielle du peptide aux molécules du CMH I dans le RE plutôt qu'à la membrane cellulaire), une vaccination peptidique est inefficace pour induire des CTL (12).

Ainsi, différents procédés ont été employés pour changer artificiellement la voie de présentation des protéines exogènes, vers une voie de présentation par des molécules du CMH I (translocation dans le cytosol) .

II. Les différentes méthodes visant à transloquer les protéines exogènes dans le cytosol

II.1. Utilisation de vecteurs viraux et bactériens

La propriété de nombreux virus et bactéries d'infecter directement le cytosol de la cellule a été mise à profit par de nombreux auteurs. Des immunisations à l'aide de différents vecteurs recombinants viraux (vaccin, adénovirus, rétrovirus, poxvirus) et bactériens (*Salmonella*, BCG, *Listeria*), codants pour des antigènes tumoraux ont permis d'induire une réponse CTL spécifique contre l'antigène d'intérêt.

Ainsi, l'administration du virus de la vaccin dans lequel a été inséré l'ADNc codant pour l'antigène carcinoembryonnaire (ACE : antigène surexprimé dans de nombreuses tumeurs épithéliales) chez des patients atteints de cancers du colon a permis de générer une réponse T cytotoxique spécifique des épitopes dérivés de l'ACE (13).

La vaccination de souris par *Listeria monocytogenes* recombinée exprimant un antigène nucléoprotéique dérivé du virus influenza a entraîné des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ effectrices spécifiques de peptides dérivés de cet antigène (14). Cependant, les risques post-vaccinaux liés à l'emploi de tels vecteurs vivants, notamment chez les individus immunodéprimés, limitent leur utilisation.

II.2. Utilisation de protéines exogènes

Plusieurs équipes ont recherché en parallèle diverses stratégies pour obtenir une immunité basée sur des lymphocytes T cytotoxiques dans des modèles tumoraux ou d'infections virales.

II.2.1. Peptides

Dans la majorité des cas, l'administration de peptides ou protéines exogènes non modifiés, n'est pas efficace pour induire des CTL. Cependant, deux groupes indépendants ont montré une régression tumorale partielle chez des individus traités avec des peptides seuls. Ainsi, l'injection d'un peptide dérivé d'un antigène tumoral muté dans une tumeur pulmonaire murine associée à de l'adjuvant incomplet de Freund permet de traiter des micrométastases après chirurgie (15).

Chez l'homme, l'injection du peptide Mage 3 seul sans adjuvant a entraîné des réponses cliniques partielles chez des patients atteints de mélanome (12).

Ces résultats restent controversés par d'autres protocoles mettant en évidence une tolérance induite suite à la vaccination par des peptides tumoraux (16).

II.2.2. Peptides et Adjuvants

Une autre approche pour l'induction de lymphocytes T cytotoxiques a été recherchée par immunisation peptidique en présence d'adjuvants immunostimulants:

- complexes immunostimulants (ISCOM (Immunostimulating complexes), mixture de Quil A (saponine) et cholestérol qui forme des micelles) ; QS21, un composant actif de la Quil A ;
- émulsions eau/huile en présence d'un agent émulsifiant, le mannide mono-oléate, ce qui constitue l'adjuvant incomplet de Freund ;
- émulsions d'huile dans l'eau composées de pluronic, squalane et Tween ; des émulsions avec le monophosphoryl lipid A, une forme détoxifiée du lipopolysaccharide de *Salmonella typhimurium* (11).

Ces préparations permettent des modifications de la présentation physique de l'antigène sous forme de réseau ou d'agrégats, ralentissant son catabolisme et favorisant sa présentation. Elles agissent essentiellement sur les cellules présentatrices d'antigène pour stimuler les cosignaux d'activation (expression de molécules d'adhésion et de cytokines).

II.2.3. Peptides modifiés

Peptides fusionnés à une séquence signal

L'utilisation d'un peptide minimal fusionné à une séquence signal du réticulum endoplasmique à son extrémité terminale semble plus efficace que le peptide seul dans l'induction d'une réponse CD8+ spécifique MHC classe II indépendante (17)

Lipopeptides

Les liposomes sont des dérivés lipidiques complexes qui semblent efficaces pour induire *in vivo* des CTL spécifiques, comme l'ont montré des protocoles vaccinaux murins utilisant des lipoprotéines spécifiques (18) ou des molécules lipidiques (19) couplées à un antigène viral. Cependant, les mécanismes de présentation par classe I de ces antigènes ne sont pas clairement connus.

II.3. Antigène sous forme particulaire

L'utilisation de protéines, sous forme particulaire couplées à des billes de latex (20), ou certaines protéines virales capables de s'auto-assembler comme des pseudo particules virales, semble efficace pour induire *in vivo* des CTL (21). Une internalisation de ces antigènes particuliers par phagocytose avec fuite dans le cytosol de peptides issus du phagolysosome a été évoquée pour expliquer ce phénomène (22).

II.4. Utilisation d'ADN nu

Une immunisation de souris par de l'ADN codant pour un peptide p53 muté peut induire des CTL contre ce peptide (23).

Dans des modèles animaux, la vaccination par de l'ADN plasmidique codant pour différents antigènes viraux a entraîné une réponse CTL associée à une protection efficace contre une infection secondaire virale (virus HIV, Grippe, Hépatite B) (24).

II.5. Utilisation de cellules présentatrices sensibilisées *in vitro* avec l'Ag d'intérêt

La simple immunisation avec des antigènes sous forme de protéines recombinantes solubles n'entraîne que rarement l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques, les antigènes exogènes étant internalisés vers une voie de présentation de classe II et présentés aux lymphocytes T CD4. Les cellules dendritiques semblent particulièrement spécialisées dans ce mécanisme de présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Différentes études convergent *in vitro* et *in vivo* chez la souris pour montrer leur capacité à phagocyter des antigènes exogènes (ou corps apoptotiques) et de présenter des peptides dérivés des protéines internalisées de manière restreinte par le CMH I (25,26).

Chez l'homme, des réponses CTL ont été observées après sensibilisation de cellules dendritiques autologues pulsées *in vitro* avec des peptides spécifiques de mélanome ou des lysats tumoraux autologues suivi de leur injection *in vivo* (27).

Ainsi, différentes méthodes visant à transloquer des protéines exogènes dans le cytosol ont été développées. La plupart de ces pistes présente encore actuellement des limites en termes d'efficacité, de reproductibilité d'un modèle à l'autre, ou de sécurité (vecteurs viraux, ADN nu). Au laboratoire, un nouvel outil de

l'autre, ou de sécurité (vecteurs viraux, ADN nu). Au laboratoire, un nouvel outil de vectorisation intracellulaire des protéines a été développé, reposant sur l'utilisation du fragment B de la toxine de *Shigella dysenteriae*.

III. Utilisation du fragment B de *Shigella dysenteriae* comme outil de vaccination anti-tumorale

III.1. Origine et structure

La toxine de *Shigella dysenteriae* appartient à la famille des Shiga toxines, cytotoxines associées à des maladies diarrhéiques et au syndrome hémolytique et urémique. Ce groupe inclue la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1 et les vérotoxines produites par des *Eschérichia coli* entéropathogènes (28).

Cette toxine a une structure bipartite consistant en une sous-unité A (ribosomal RNA N-glycosidase, inhibant la biosynthèse des protéines dans les cellules de Mammifères) associée de manière non covalente à un homopentamère B, sous-unité non toxique (29). Les structures de l'holotoxine et des fragments pentamériques seuls ont été révélées par cristallographie aux rayons X et par des études RMN : le pentamère B a une structure régulière dans laquelle l'axe central est formé par les hélices α des 5 monomères.

III.2. Cellules cibles et interaction cellulaire

Différents types cellulaires sont sensibles *in vivo* à l'action de la toxine (comme les macrophages, les lymphocytes B activés, les cellules des villosités intestinales) tandis que d'autres cellules (comme les cellules T et les cellules de la crypte intestinale) ne montrent pas d'activité de liaison (30). Des études de modélisation et des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que l'internalisation de la toxine dépendait du fragment B, interagissant avec un récepteur cellulaire, le glycolipide globotriaosylcéramide (Gb3) ; chaque pentamère étant en contact avec 15 molécules de Gb3. Bien que la présence de sites liant la sous-unité B sur les cellules ne soit pas un critère suffisant pour prédire la sensibilité cellulaire à l'action de cette toxine, l'expression du récepteur Gb3 semble nécessaire pour l'entrée de la toxine dans les cellules cibles (31). Sandvig et al. ont montré que le récepteur glycolipidique médie l'endocytose du complexe Gb3-toxine à travers des puits recouverts de clathrine (32).

III.3. Transport intra-cellulaire du fragment B

Des études sur des cellules cancéreuses A 431 traitées par l'acide butyrique, un inducteur de Gb3, et sur des cellules HeLa non traitées, ont montré une localisation de la toxine après internalisation dans l'appareil de Golgi et dans le réticulum endoplasmique (32). Un transport rétrograde de la toxine de la membrane plasmique vers le RE via les endosomes et l'appareil de Golgi (33) a été décrit, faisant ensuite intervenir la protéine chaperonne BiP résidente du RE pour la translocation du RE vers le cytoplasme (34).

III.4. Fragment B comme vecteur de ciblage de protéine exogène dans une voie de présentation restreinte par le CMH de classe I

Lors d'un premier travail réalisé au laboratoire, il a été montré que des protéines de fusion constituées de ce fragment B et de peptides dérivés d'antigènes tumoraux (Mage 1, Mart..) permettaient la présentation de ces peptides à des lymphocytes T cytotoxiques de façon restreinte par les molécules de CMH I (35). Ces résultats ont été récemment confirmés par d'autres groupes où des cellules sensibilisées, par une toxine apparentée à la toxine de *Shiga* couplée à un peptide dérivé du virus de l'influenza, pouvaient être lysées par des CTL spécifiques du peptide (36).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Ce travail expérimental a été effectué au cours du stage de DEA ("Bases génétiques et moléculaires du système immunitaire normal et pathologique" Paris V) dans le laboratoire U255 du Pr. W.H.Fridman, sous la direction du Dr. E.Tartour.

Il a consisté dans une première partie à démontrer, dans un modèle murin, la capacité d'une protéine de fusion associant le fragment B de la toxine de *Shiga* et un peptide dérivé de l'ovalbumine à cibler une voie de présentation restreinte par le CMH I, puis à en analyser les mécanismes.

Dans une deuxième partie, nous avons cherché à l'aide d'une protéine de fusion associant le fragment B au peptide P1A, peptide dérivé d'un antigène tumoral surexprimé dans le mastocytome P815, à générer *in vivo* des CTL spécifiques chez la souris.

I. Matériel et Méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Peptides

Le peptide SL8 correspond au peptide : SIINFEKL dérivé de l'ovalbumine de poulet (AA 257-264) et restreint pour sa présentation par la molécule de CMH I K^b (45).

Le peptide P1A correspond au peptide : LPYLGWLVF dérivé de la protéine P815 AB (AA 35-43) exprimée par le mastocytome P815. Ce peptide est restreint pour sa présentation par la molécule de CMH I L^d (46).

Ces peptides ont été synthétisés par la société Altergen (Schiltigheim 67300. France).

1.1.2. Lignées cellulaires et milieux de culture

- D1 : Culture primaire de cellules dendritiques originaires de souris femelles C57 BL6 (H-2b) de 6 à 10 mois (37).

Les cellules murines suivantes proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) :

- P815 : lignée dérivée d'un mastocytome obtenu chez des souris DBA/2 (H-2d) traitées avec du méthylcholanthrène. Le mastocytome P815 exprimant 5 antigènes immunodominants : A,B,C,D,E (38) .
- P1.204 : variant antigénique de la lignée P815 n'exprimant pas les antigènes A (P1A) et B de la lignée P815, mais gardant la sensibilité d'être lysé par les clones CTL anti-C, anti-D et anti-E (38).
- L1210.P1A.B7 : lignée obtenue par transfection de l'ADN de P1A et B7.1 par co-électroporation de L1210 (lignée de lymphome de souris DBA/2 ne comportant pas d'Ag spécifique de la lignée P815) (39).
- B3Z : Hybridome T spécifique du peptide SL8 restreint par K^b obtenu par fusion de la cellule Z8 exprimant le gène bactérien lacZ (précédé du promoteur de l'IL2 humain), et du clone B3 reconnaissant spécifiquement le peptide SL8 restreint par K^b (40). Lors de reconnaissance spécifique du peptide SL8 restreint Kb, l'activité de l'hybridôme B3Z T est révélée par colorimétrie en mesurant l'activité LacZ des surnageants.
- B2B3 = IIA1.6 : cellules de lymphome B transfectées avec l'ADNc codant pour la molécule H-2K^b (41).
- D2SC1 : lignée obtenue par immortalisation rétrovirale (rétrovirus d'origine aviaire) de cellules dendritiques de rate de souris Balb/c, d'haplotype H-2K^b (42).

Ces lignées cellulaires ont été utilisées pour l'analyse de la présentation de 2 peptides différents, dans deux systèmes de présentation restreinte au CMH I distincts:

Peptides		SL8	P1A
Contexte de présentation CMH I		CMH -I K ^b (souris C57BL6)	CMH -I L ^d (souris DBA/2)
Lignées cellulaires utilisées	Effectrices	Dendritiques: D1, D2SC1 Lymphome B: B2B3	L210.P1A.B7
	Cibles		P815

Les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C dans des flasques Falcon de 250 ml, en atmosphère humide contenant 5% de CO2 dans un milieu complet :

RPMI 1640 avec Glutamax-1 (Gibco-Life Technologies, Paisley, Angleterre) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF)(Dominique Dutscher Burmath, France) décomplémenté 45 minutes à 56°C ainsi que des réactifs suivants (Gibco-Life Technologies, Paisley, Angleterre) : L-glutamine à 2 mM, pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 UI/ml), pyruvate de sodium (1 mM) et β 2-mercaptoéthanol (50 μ M).

Les cellules D1 sont cultivées à 37°C dans des boîtes de culture (Greiner) en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans un milieu IMDM complet (Sigma) supplémenté avec 30% de surnageant dérivé de la lignée NIH/3T3 transfectée avec l'ADNc du GM-CSF murin (Surnageant R1 contenant 200 ng/ml de GM-CSF), 10% de sérum de veau foetal (Dominique Dutscher, Brumath, France) ainsi que des réactifs suivants (Gibco-Life Technologies, Paisley, Angleterre) : L-glutamine à 2 mM, pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 UI/ml), pyruvate de sodium (5 mM).

1.1.3. Anticorps

L'anticorps anti-H-2K^b utilisé est le clone IgG2a AF6-88.5. L'anticorps anti-H-2L^d utilisé est le clone IgG2a 28-14-8. Un anticorps isotypique contrôle est également employé (Clone G155-178 obtenu à partir de KLH-TNP). Tous les anticorps ont été obtenus chez Pharmingen-Beckton Dickinson (Le Pont de Claix, France), et ont été utilisés sous forme biotinylée.

De la streptavidine marquée au FITC a été obtenue chez Dako (Trappes, France). Un anticorps isotypique contrôle IgG1 FITC a été acheté chez Beckton Dickinson.

1.1.4. Adjuvants utilisés

Interleukine 2 humaine recombinante (Chiron, France).

Adjuvant incomplet Freund (Difco Laboratories Detroit Michigan, USA).

1.1.5. Inhibiteurs et fixateurs

PPMP : 1-phenyl-2-hexadécanoylamino-3-morpholino-1-propanol est un inhibiteur de la synthèse des céramides glycosylés et des gangliosides. Il n'inhibe pas la synthèse des glycoprotéines(43). Il a été fourni par le Dr L. Johannes (Institut Curie).

La lactacystine est un inhibiteur spécifique du protéasome (44) acheté chez Tebu (BIOMOL Research Laboratories, Inc , Plymouth Meeting U.S.A).

La Paraformaldéhyde à 0,5% final a été obtenue chez Sigma.

1.1.6. Autres réactifs

Ovalbumine (ICN Pharmaceuticals, France SA. Orsay, France).
Ionomycine et Acétate de Phorbol Myristate (Sigma, France).

1.1.7. Production des protéines recombinantes Shiga B-P1A et Shiga B-Ova (SL8)

Les protéines de fusion Shiga-P1A et Shiga-SL8 ont été synthétisées dans le laboratoire de B. Goud (CNRS UMR 144. Institut Curie) et fournies par L. Johannes (CNRS UMR 144. Institut Curie).

Les séquences codantes pour le fragment B de la toxine de Shiga et des peptides P1A ou SL8 ont été insérées dans le vecteur pSU 108. Les protéines ont été produites dans la souche d'*E. Coli DH5α* transformée avec le vecteur pSU-108 recombinant.

Du fragment B recombinant couplé au DTAF (Shiga-DTAF) a été produit comme précédemment décrit (35).

1.2. Méthodes

1.2.1. Etude de l'expression membranaire des molécules du CMH I et de Gb3 par immunofluorescence

Entre 2 et $5 \cdot 10^5$ cellules sont incubées pendant 30 ou 45 minutes avec des anticorps primaires biotinylés à $10 \mu\text{g/ml}$. Les cellules sont lavées 2 fois avec 2 ml de tampon phosphate (PBS) à 3000 tr/min pendant 5 minutes. La fixation des anticorps primaires biotinylés est ensuite révélée par de la streptavidine-FITC diluée au $1/50^\circ$ dans une solution de PBS et laissée à incuber 30 min à 4°C .

Pour analyser l'expression à la surface des cellules du récepteur Gb3 de la toxine de Shiga, les cellules sont incubées 45 minutes avec le fragment B de la toxine de Shiga couplé au DTAF (5-(4,6-dicholorotriazin-2-yl)amino fluorescein) ou au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) pour cytométrie de flux. A la fin de l'expérience, les cellules sont fixées dans $500 \mu\text{l}$ d'une solution de PBS à 0,5% de formaldéhyde (BDH Chemicals Ltd, Dorset, England). L'intensité de fluorescence des cellules est ensuite analysée par cytométrie de flux à l'aide d'un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

1.2.2. Test de présentation antigénique (peptide SL8 / lignée B3ZT)

Cent microlitres de cellules présentatrices d'antigène correspondant à 10^5 cellules sont déposées dans des microplaques de 96 puits à fond plat (Costar). Ces cellules sont ensuite mises en présence de l'antigène ou du peptide d'intérêt. Après 2 lavages en PBS stérile, les cellules sont mises en contact avec l'hybridome B3ZT ($2 \cdot 10^5$ cellules dans 100 μ l) à 37°C, durant 12 heures.

L'activation de l'hybridome B3Z T est révélée par colorimétrie en mesurant l'activité LacZ des surnageants. A cet effet on ajoute à la réaction une solution constituée de 0.5% NP40 (éthylphénylpolyéthylenglycol, Mallet SA Chemicals, France) et d'ONPG (150 μ g/100 μ l) (O-Nitrophényl β -D-Galactopyranoside, Sigma (97H5228)), substrat de la β -galactosidase.

Les lectures de densité optique sont effectuées à 405 nm sur lecteur de microplaques (Labsystems Multiscan MS).

1.2.3. Obtention de lymphocytes par immunisation et stimulation in vitro

Les souris DBA/2 (H-2^d) femelles âgées de 6 à 7 semaines ont été obtenues chez Iffa Credo (Lyon, France). Les souris sont immunisées par 3 injections à 1 semaine d'intervalle avec les différents antigènes.

A J28, les cellules spléniques immunes sont isolées après prélèvement des rates dans du PBS et broyage sur tamis stérile en milieu DMEM (Gibco-Life Technologies) additionné de 10% SVF ainsi que des réactifs suivants (Gibco-Life Technologies, Paisley, Angleterre) : L-arginine (116mg/l), L-asparagine (36 mg/l), β -2-mercaptoéthanol 50 μ M, pyruvate (1 mM), pénicilline-streptomycine (100 UI/ml), glutamine (2mM).

Les cellules spléniques sont stimulées in vitro en présence de cellules présentatrices dans des puits de 2 ml (plaque Costar de 24 puits) : $5 \cdot 10^6$ cellules spléniques immunes + $2 \cdot 10^5$ cellules L1210.P1A.B7 irradiées à 10000 Rad/min et 100 U/ml d'IL2 sont mis en présence. Les plaques sont déposées dans l'incubateur à 37°C pendant 4 jours.

1.2.4. Test de cytotoxicité (peptide P1A)

Les cellules P815 et P1.204 cibles ($5 \cdot 10^6$) sont marquées avec 200 μ Ci de Cr⁵¹ (NEN Life, Paris, France) dans un volume de 250 μ l de milieu de culture. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les cellules cibles sont lavées 2 fois en milieu RPMI 1640 puis laissées environ 30 à 40 minutes à température ambiante dans 10 ml de RPMI 1640 (phase de relargage). Les cellules cibles sont ensuite ajustées à $5 \cdot 10^4$ cellules/ml.

Dans des plaques de 96 puits à fonds coniques (Costar, 96 puits), aux 100µl de cellules effectrices déposées à différents ratios (effecteurs/cibles : 100/1;50/1;25/1;12,5/1;6,25/1) sont ajoutées 5000 cellules cibles dans 100µl de milieu RPMI par puits. Après 4h d'incubation à 37°C, 100µl de surnageant sont déposés dans des microtubes et la radioactivité est comptée au compteur γ .

Le pourcentage de relargage spécifique de Cr^{51} est calculé selon la formule :

$$\% \text{ de relargage spécifique} = [(\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage maximum} - \text{relargage spontané})] \times 100.$$

II. Résultats

II.1. Mise en évidence d'une présentation, restreinte par le CMH I, de peptides dérivés de protéines de fusion exogènes incluant le fragment B de la toxine de Shigella

II.1.1. Distribution du récepteur Gb3 du fragment B de la toxine de Shiga et de l'allèle K^p du CMH I à la surface de différents types cellulaires

Des études de modélisation et de mutagenèse dirigée ont montré que le fragment B de la toxine de Shiga interagissait avec le récepteur Gb3 à la surface des cellules et que l'expression de ce récepteur semblait nécessaire pour l'entrée de la toxine dans les cellules cibles (29).

Afin de caractériser les cellules présentatrices d'antigènes susceptibles de présenter des peptides dérivés de protéines de fusion incluant le fragment B de Shiga, nous avons mesuré l'expression du récepteur du fragment B de la toxine sur différents types cellulaires et la présence de l'allèle Kb, élément de restriction du peptide SL8 dérivé de l'ovalbumine. Les cellules ont été incubées avec le fragment B de la toxine couplé à un fluorochrome (le DTAF), et avec l'anticorps biotynilé anti-H2 K^p; l'immunofluorescence est analysée par cytométrie de flux.

La figure 1A montre une expression de l'allèle K^p uniquement à la surface des cellules de l'hybridome B (B₂-B₃) et des cellules dendritiques D1. Par ailleurs, les cellules D1 lient de façon très significative le fragment B tandis que le niveau d'expression de Gb3 semble plus faible sur la lignée dendritique D2SC1 (Figure 1B). Les cellules de lymphome B, B2B3, ne semblent pas exprimer le récepteur Gb3.

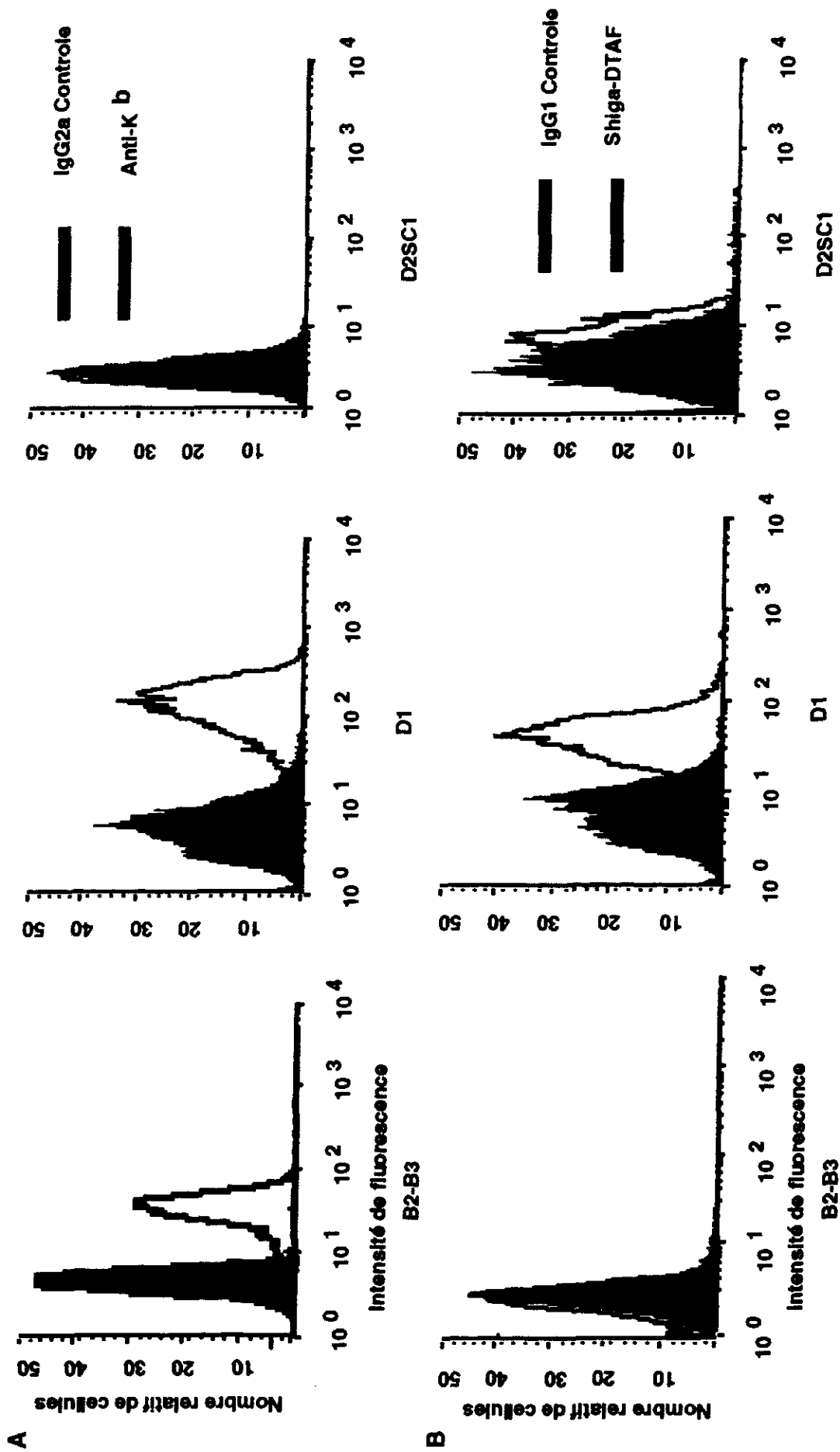


Figure 1 : Expression du récepteur Gb3 pour le fragment B de la toxine de Shiga et de l'allèle Kb du CMH I à la surface de différents types cellulaires.

(A) L'expression de Kb à la surface des cellules dérivées du lymphome B, B2-B3, et des cellules dendritiques D1 et D2SC1 est mesurée par cytométrie de flux. Les cellules sont incubées 30 min à 4°C avec les anticorps biotinylés anti-H-2K^b (10 µg /ml) ou IgG2a (contrôle isotypique à 10 µg /ml). La liaison des anticorps biotinylés est révélée par de la streptavidine couplée au FITC incubée pendant 30 min à 4°C. L'immunofluorescence est analysée par cytométrie de flux.

(B) L'expression du récepteur Gb3 du fragment B de la toxine de Shiga à la surface des cellules B2-B3, D1 et D2SC1 est analysée par cytométrie de flux. Les cellules sont incubées 45 min à 4°C avec le fragment B de la toxine de Shiga couplé à un fluorophore, le DTAF, ou avec un anticorps IgG1 contrôle couplé à ce même fluorophore.

Expression du récepteur Gb3 du fragment B de la toxine de Shiga et de l'allèle K^b du CMH I à la surface des différents types cellulaires :

	dendritiques		lymphome
	D1	D2SC1	B2B3
CMH I (K ^b)	+	-	+
Gb3	+	+/-	-

II.1.2. Démonstration de la capacité des cellules dendritiques D1 à présenter à un hybridome T, le peptide SL8 dérivé d'une protéine de fusion Shiga-SL8.

La figure 2 montre que seules les cellules dendritiques D1 sensibilisées avec la protéine de fusion Shiga-SL8 sont capables de présenter le peptide SL8 à l'hybridome T B3Z reconnaissant le peptide SL8 de façon restreinte par l'allèle K^b (et pas les cellules D2SC1 et B2B3).

Afin d'éliminer tout biais dans l'activation de l'hybridome T, nous avons montré que la mise en contact des cellules présentatrices d'antigène avec l'hybridome T en l'absence d'antigène n'induisait pas la transcription du gène LacZ reflet de l'activation de l'hybridome T (Figure 2).

Dans les mêmes conditions, le chargement direct du peptide SL8 sur les différentes cellules présentatrices d'antigène montre que seules les cellules exprimant l'allèle K^b (B2-B3, D1) sont capables de présenter le peptide SL8 à l'hybridome T (absence d'expression de K^b à la surface des cellules D2SC1) (Figure 2).

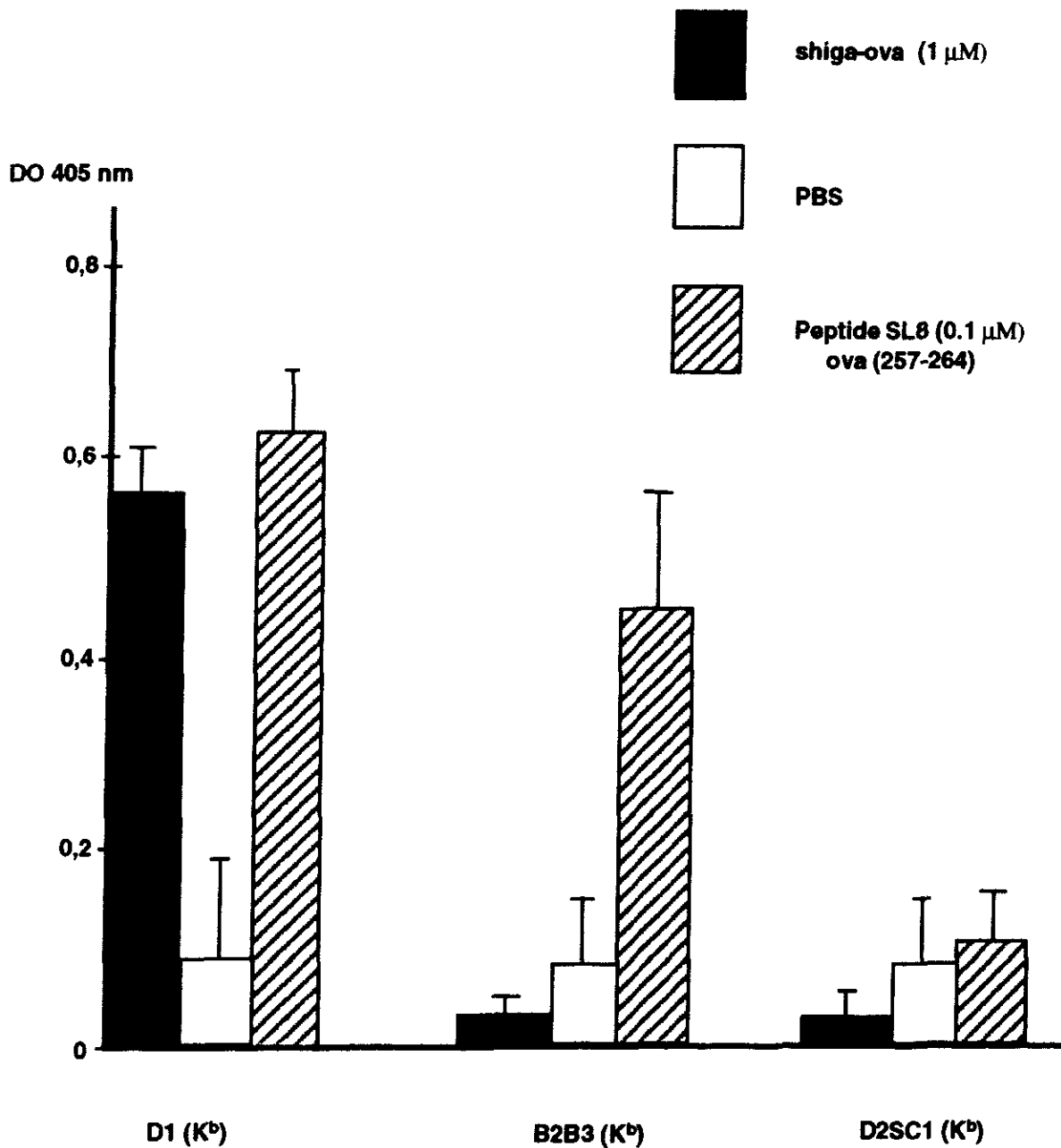


Figure 2 : Reconnaissance par un hybridome T spécifique du peptide SL8 dérivé de l'ovalbumine et restreint par l'allèle Kb du CMH I après sensibilisation de différents types cellulaires avec la protéine de fusion Shiga-SL8.

Différents types cellulaires B2-B3 (K^b), D1(K^b) et D2SC1(L^d) sont incubés pendant 4h à 37°C avec la protéine de fusion Shiga-SL8 (1μM), le peptide SL8 (0,1μM) ou du PBS. Après 2 lavages, les cellules sensibilisées sont mises en contact durant 12h à 37°C avec les cellules B3Z (hybridome T spécifique du peptide SL8(257-264) restreint par Kb). L'activation des cellules T est mesurée par colorimétrie des surnageants en utilisant le substrat ONPG (1,5 mg/ml dilué dans 0,5% de NP40). Les lectures de densité optique s'effectuent à 405 nm.

II.2. Analyse du mécanisme de la présentation CMH I restreinte de peptides dérivés de protéines exogènes par les cellules dendritiques D1

II.2.1. Rôle de l'internalisation dans le "processing" et la présentation du peptide SL8 dérivé de la protéine de fusion Shiga-SL8

Afin de montrer que la présentation par les cellules dendritiques D1 du peptide SL8 vectorisé par B-Shiga nécessite une internalisation de la protéine (et éliminer ainsi un biais secondaire à une dégradation extra-cellulaire de la protéine et un chargement direct du peptide sur l'allèle K^p), les cellules dendritiques ont été préalablement fixées ou non par de la paraformaldéhyde (PFA) avant leur incubation avec la protéine de fusion Shiga-SL8 ou le peptide SL8 seul (Figure 3).

Comme attendu, le peptide SL8 seul est capable de se fixer aussi bien sur les cellules dendritiques fixées ou non par de la PFA, contrôlant ainsi que l'étape de fixation n'a pas altéré les différents éléments de présentation de la cellule. En revanche, seules les cellules non fixées sont capables de présenter à l'hybridome T le peptide SL8 dérivé de la protéine Shiga-SL8.

Cette expérience démontre ainsi la nécessité d'une internalisation de la protéine pour son "processing" et le ciblage de la voie du CMH I. Une dégradation extracellulaire de cette protéine ne semble donc pas à l'origine d'une présentation du peptide SL8 issue de la protéine Shiga-SL8.

II.2.2. Sensibilité du système de présentation de peptides dérivés de protéines exogènes par les cellules dendritiques D1

Une courbe dose-réponse est réalisée en incubant les cellules dendritiques fixées ou non par la PFA avec des doses croissantes de la protéine Shiga-SL8.

Une activation de l'hybridome T est obtenue à partir de 1nM de protéine recombinante sensibilisante (Figure 4). Le plateau est atteint après mise en contact des cellules dendritiques avec 100 nM de protéine de fusion Shiga-SL8.

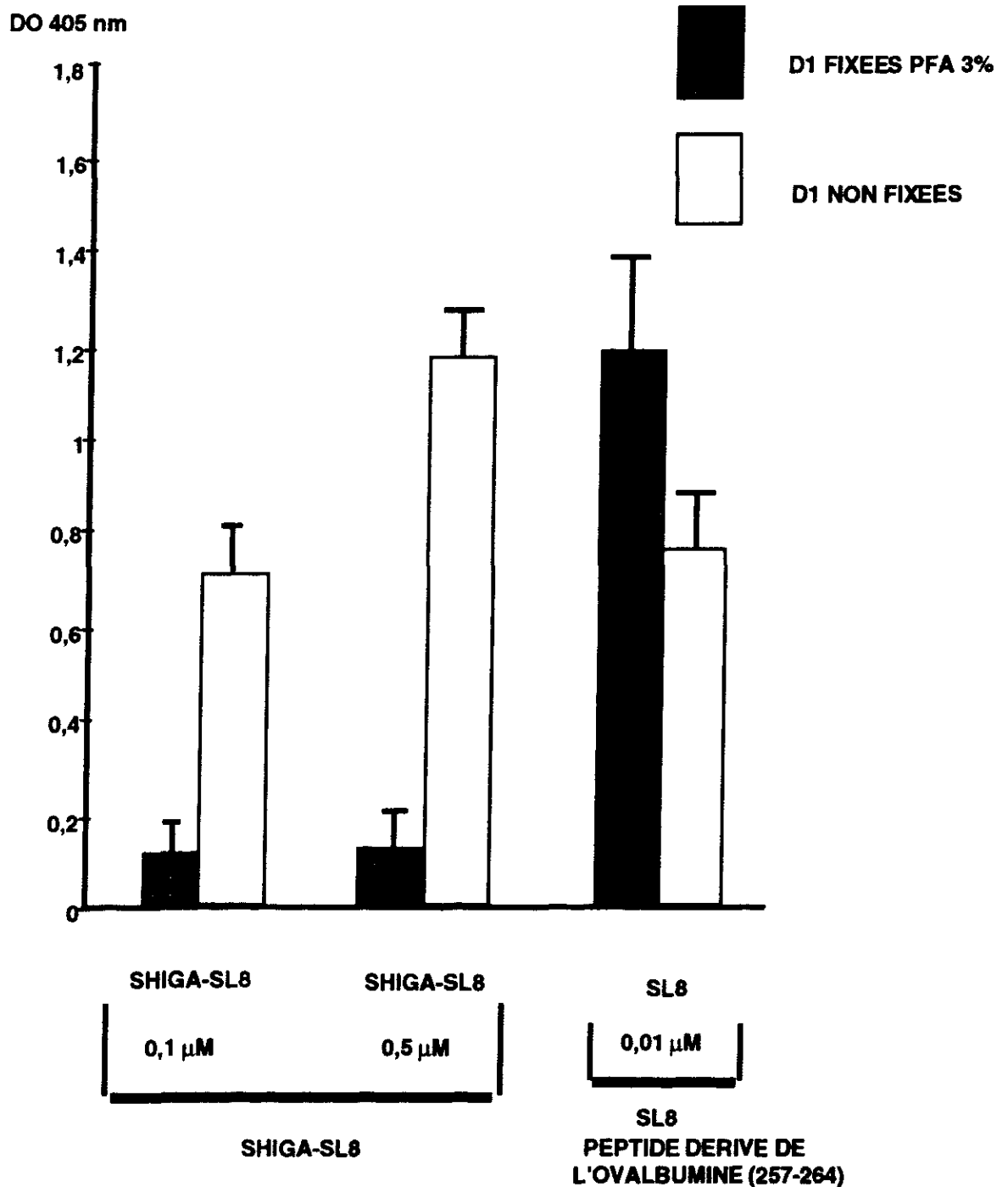


Figure 3 : Rôle de l'internalisation dans la présentation CMH I restreinte du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de la toxine de Shiga

Les cellules D1 sont incubées 10 min à température ambiante avec de la Paraformaldéhyde à 3%. Après 3 lavages, les cellules sont incubées durant 4h à 37°C avec la protéine de fusion Shiga-SL8 (0,1μM ou 0,5μM) ou SL8 (0,01μM). Après 2 lavages, elles sont mises en présence des cellules B3Z (hybridome T spécifique d'OVA(257-264)-Kb) pendant 12 heures. La révélation s'effectue comme indiquée à la figure 2

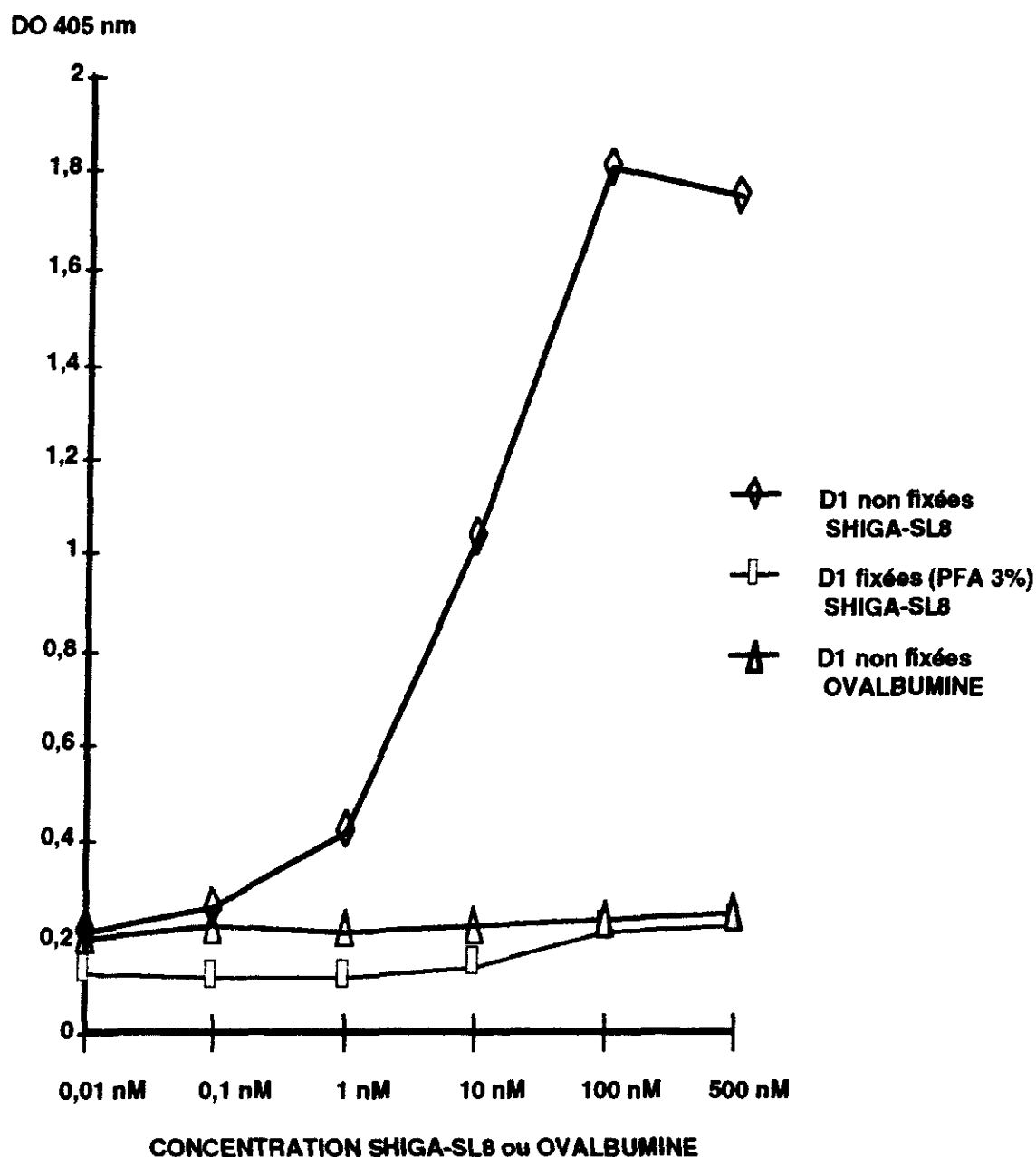


Figure 4 : Comparaison de l'efficacité de présentation du peptide SL8 par les cellules dendritiques D1 (fixées ou non) après une sensibilisation des cellules avec de l'ovalbumine ou la protéine de fusion Shiga-SL8.

Les cellules sont préalablement incubées 10 min à température ambiante avec de la PFA 3% ou du PBS. Après lavage, elles sont sensibilisées pendant 4h à 37°C avec de l'ovalbumine ou la protéine de fusion Shiga-SL8 à différentes concentrations. Après 2 lavages, les cellules sont mises en présence des cellules B3Z. L'activation de B3Z est révélée comme indiquée dans la figure 2.

La fixation préalable des cellules dendritiques inhibe toute présentation du peptide SL8 inclus dans la protéine Shiga-SL8 même pour des concentrations de l'ordre de 500 nM de protéines de fusion (Figure 4).

11.2.3. Rôle du fragment B dans le routage du peptide SL8 vers une voie de présentation restreinte par le CMH-I

Afin de démontrer l'intérêt de vectoriser le peptide SL8 par le fragment B pour permettre sa présentation de manière CMH I restreinte, une analyse de la présentation du peptide SL8 par les cellules dendritiques D1 a été réalisée lorsque celui-ci était inclus dans l'ovalbumine native.

Comme le démontre la figure 4, aucune présentation du peptide SL8 n'est observée dans ce cas, démontrant l'intérêt du fragment B comme système de vectorisation.

11.2.4. Vectorisation du peptide SL8 par le fragment B vers une voie de présentation restreinte par le CMH I

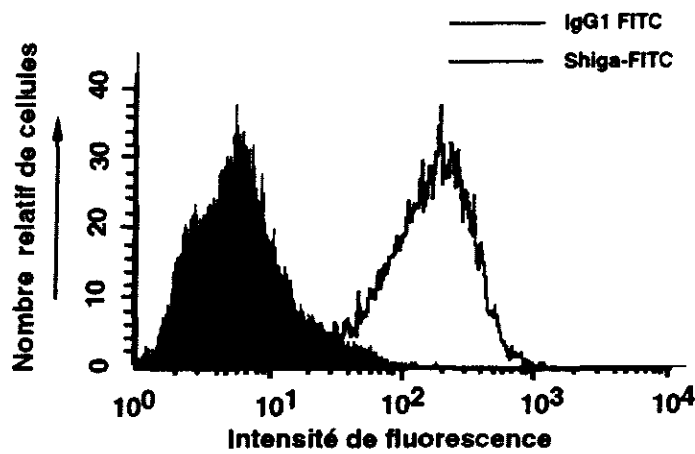
Afin de démontrer le rôle du récepteur glycolipidique Gb3 dans le routage de la protéine Shiga-SL8 dans ce modèle de présentation restreint par le CMH I, nous avons utilisé un inhibiteur de la biosynthèse des céramides, le PPMP, de façon à moduler l'expression de ce récepteur.

Dans une première expérience, nous vérifions que les cellules D1 perdent l'expression de Gb3 lorsqu'elles sont cultivées en présence de PPMP (révélation par la fixation de la toxine Shiga marquée), tout en conservant celle de l'allèle K^b (observée par un anticorps anti- K^b) (Figure 5A).

Les 2 figures 5A et 5B nous indiquent que la culture des cellules D1 en l'absence de l'inhibiteur permet une présentation du peptide SL8 dérivé de la protéine de fusion Shiga-SL8, alors que cette présentation est totalement inhibée lorsque les cellules D1 ont perdu l'expression membranaire du Gb3 après culture en présence de PPMP. La figure 5B vérifie que la présentation après le chargement direct de peptide SL8 n'est pas modifiée par la culture en présence de PPMP.

Une corrélation est donc observée entre l'expression du récepteur Gb3 et la capacité des cellules dendritiques à présenter le peptide SL8 dérivé d'une protéine de fusion Shiga-SL8.

Culture D1 en l'absence de PPMP



Culture D1 en présence de PPMP

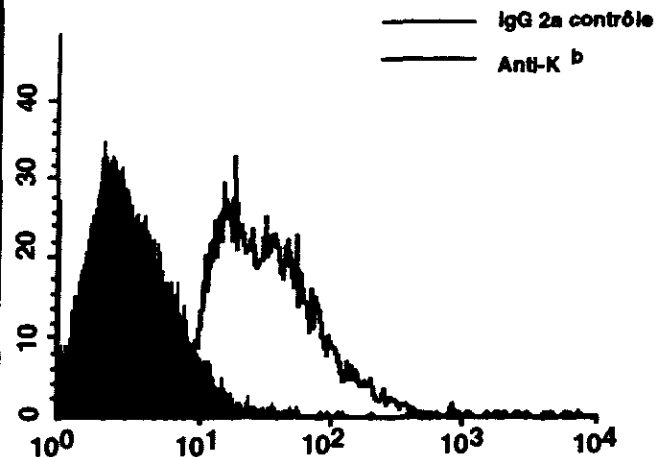
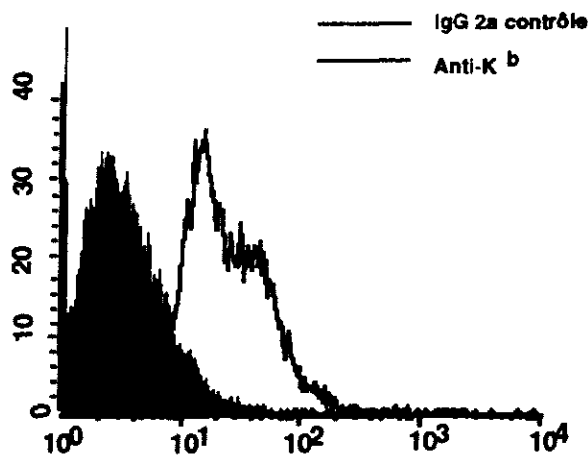
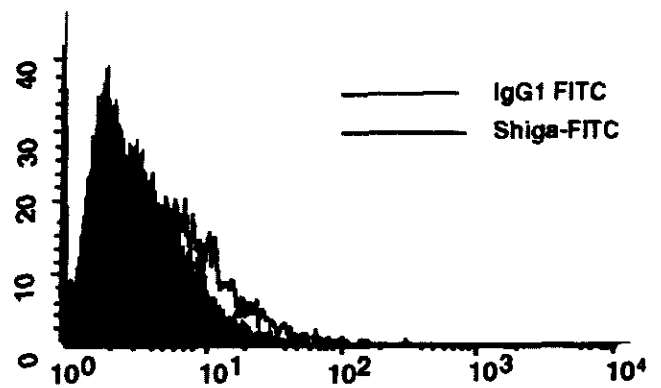


Figure 5 A : Expression du récepteur Gb3 en présence ou non de PPMP

Les cellules dendritiques, D1, sont cultivées durant 6 jours en présence de l'inhibiteur de la voie de biosynthèse des céramides, le PPMP. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours. Le PPMP est ajouté à chaque passage. L'analyse de l'expression du récepteur Gb3 et de l'allèle Kb à la surface des cellules est mesurée par cytométrie de flux.

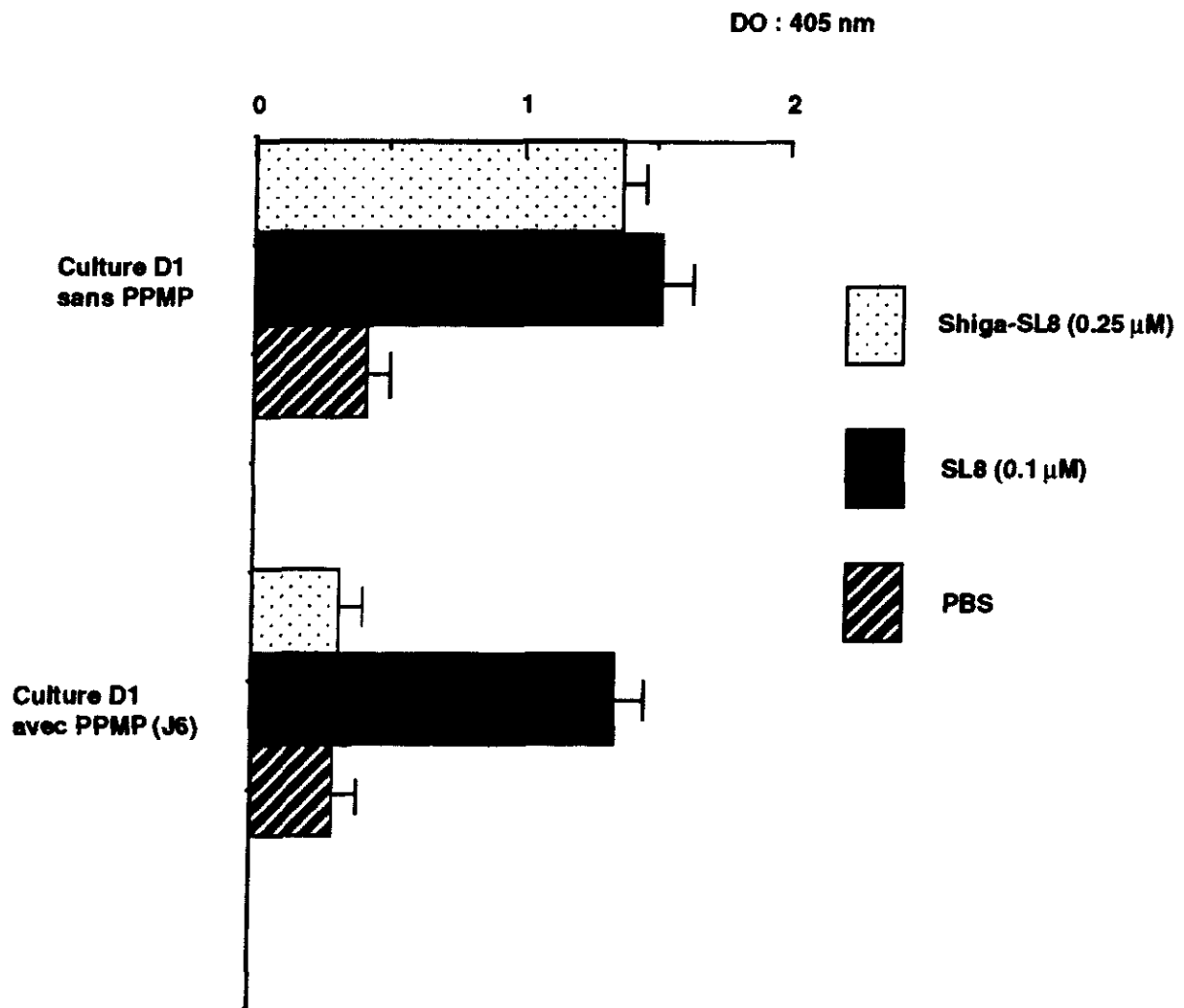


Figure 5 B : Rôle du récepteur Gb3 dans l'internalisation et le ciblage de la voie de présentation CMH I restreinte de la protéine de fusion Shiga-SL8

Les cellules dendritiques, D1, sont cultivées durant 6 jours en présence de l'inhibiteur de la voie de biosynthèse des céramides, le PPMP. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours. Le PPMP est ajouté à chaque passage. Le test de présentation est réalisé avec les cellules dendritiques cultivées ou non en présence de PPMP, et exposées ensuite aux cellules B3Z. L'activation des cellules T est mesurée par colorimétrie des surnageant en utilisant le substrat ONPG. Les lecture de densitéoptique s'effectuent à 405 nm.

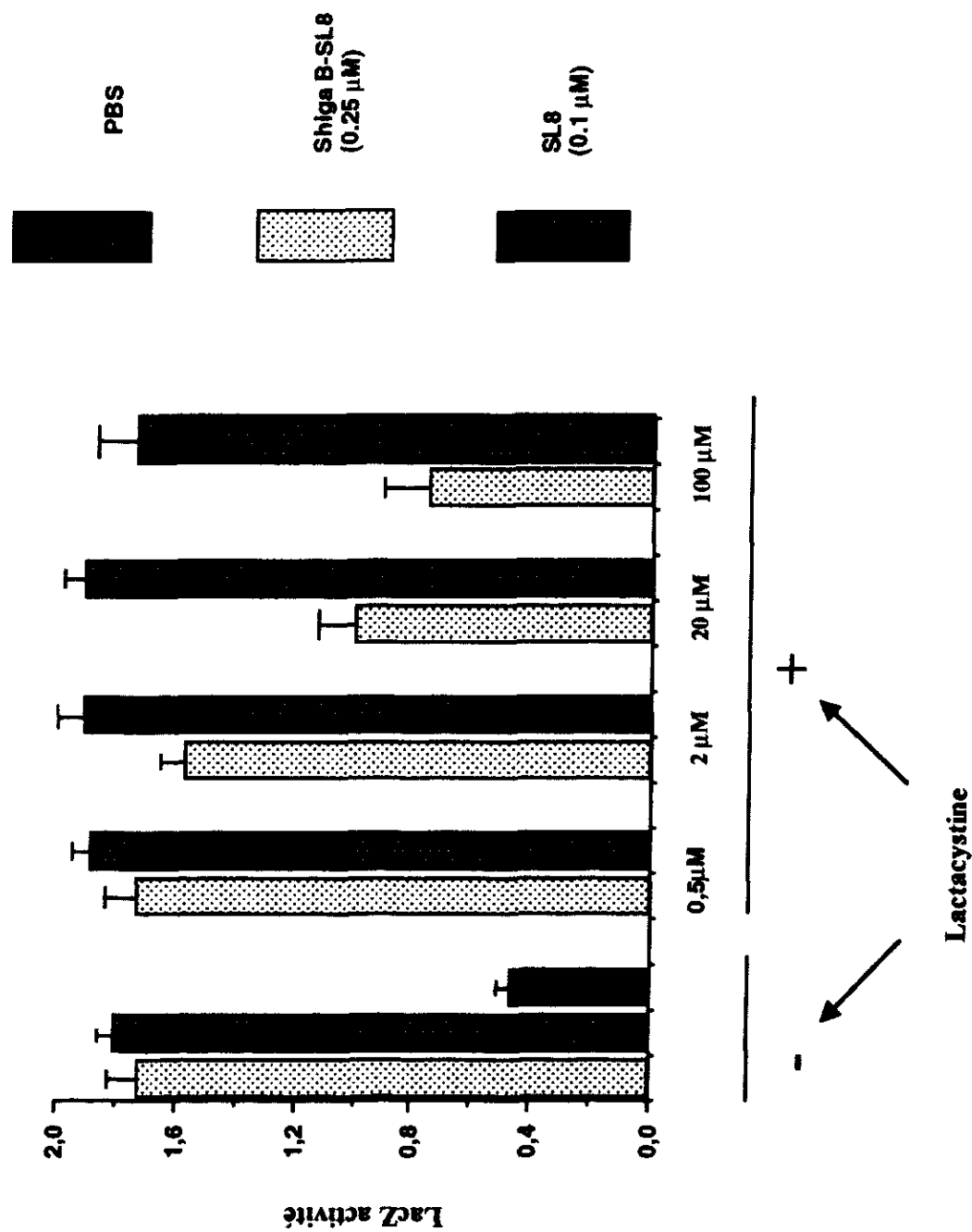


Figure 6 : Effet de la lactacystine dans la présentation CMH I restreinte du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de Shiga.

Les cellules D1 sont pré-incubées 1h à 37°C en présence des différentes concentrations de lactacystine puis sensibilisées pendant 4h à 37°C avec la protéine Shiga-SL8 (0,25 μM) ou le peptide SL8 (0,1 μM). Après lavage, les cellules sont incubées pendant 12h à 37°C avec l'hybridome B3Z. L'activation de B3Z est révélée comme indiquée dans la figure 2.

II.2.5. La présentation du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de Shiga est inhibée par la lactacystine, inhibiteur spécifique du protéasome

Afin de déterminer si la présentation du peptide SL8 vectorisé par le fragment B, nécessitait une étape de dégradation cytosolique par le protéasome, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de l'activité du protéasome, la lactacystine.

Nos résultats montrent une diminution nette de la capacité des cellules dendritiques, au cours d'une sensibilisation avec la protéine Shiga-SL8, à présenter le peptide SL8 à l'hybridome T B3Z en présence de concentrations croissantes de lactacystine (Figure 6). Cet effet est observé à partir de doses de lactacystine comprises entre 2 et 20 μ M. Dans une expérience contrôle, nous avons vérifié que la lactacystine n'affectait pas la présentation du peptide SL8 directement chargé sur les cellules dendritiques. La lactacystine dans ces conditions ne semble donc pas altérer certaines capacités de présentation des D1 et n'interfère pas avec la présentation de peptide par l'allèle K^b directement chargé.

II.3. Induction de CTL spécifiques de l'antigène P1A après immunisation de souris avec la protéine de fusion Shiga-P1A

Le peptide P1A est dérivé d'un antigène tumoral P815 AB exprimé par le mastocytome murin P815 ; celui-ci présente la particularité de n'être exprimé que dans les tumeurs (à l'exception des spermatogonies), et il représente donc l'équivalent murin de nombreux antigènes humains spécifiques de tumeurs.

Une protéine de fusion a été construite avec le peptide P1A et le fragment B de la toxine de *Shigella dysenteriae* (shiga-P1A) comme outil de vaccination. Dans le laboratoire, le groupe d'E.Tartour a montré la capacité de cellules dendritiques préalablement sensibilisées avec la protéine Shiga-P1A à présenter le peptide P1A de façon restreinte par le CMH I (résultats non montrés).

Afin d'analyser la capacité de cette protéine de fusion porteuse de l'antigène P1A à induire une réponse CTL spécifique, nous avons immunisé des souris DBA2 par 3 injections intrapéritonéales (aux jours J0, J7 et J21), de 40 μ g de Shiga-P1A en présence ou non d'adjuvant incomplet de Freund. Pour

optimiser le test, les splénocytes immuns sont isolés à partir de la rate et restimulés *in vitro* une semaine après la troisième immunisation.

Comme contrôle positif d'immunisation, nous avons employé les cellules de lymphomes L210 cotransfectées avec l'ADNc codant pour les antigènes P1A et la molécule de costimulation B7, connues pour induire facilement des CTL contre P1A. Pour démontrer un rôle du fragment B dans cette vaccination, des souris ont également été immunisées avec le peptide P1A associé à de l'adjuvant incomplet de Freund.

La figure 7A montre que le mastocytome P815 exprimant l'antigène P1A est lysé de façon significative par les splénocytes de souris immunisées avec la protéine de fusion Shiga-P1A. Des pourcentages significatifs de lyse (> 20%) sont obtenus pour des rapports effecteurs/cibles supérieurs à 10. Le peptide P1A seul associé à de l'adjuvant incomplet de Freund est inefficace pour induire des CTL capables de lyser le mastocytome P815. Des résultats similaires sont observés à partir des souris immunisées avec Shiga-P1A en présence d'adjuvant incomplet de Freund ou non et avec le contrôle positif (cellules tumorales).

Afin de contrôler que les CTL induits étaient bien spécifiques du peptide P1A, nous avons testé leur activité sur la cible P1-204, variant négatif pour l'antigène P1A du mastocytome P815 (Figure 7B). La figure 8 présente la conclusion de ces expériences où la soustraction de la cytotoxicité obtenue à partir des mêmes splénocytes sur les lignées P815 et P1-204 permet une estimation de la lyse spécifique de l'antigène P1A.

Il s'avère que les CTL induits après immunisation avec la protéine de fusion Shiga-P1A n'induisent pas de lyse significative de la lignée P1-204 pour des rapports effecteurs cibles inférieurs à 50/1. L'immunisation à l'aide la lignée L210-P1A-B7 et de la protéine de fusion Shiga P1A associée à de l'adjuvant incomplet de Freund entraîne une lyse modérée (< 30%) de la lignée P1-204 pour un rapport effecteur/cible de 50/1.

La vaccination à l'aide de la protéine Shiga P1A sans adjuvant ou du peptide P1A en présence d'adjuvant n'induit pas de CTL capables de lyser de façon significative la lignée P1-204.

Ainsi, l'immunisation par le peptide P1A associé à de l'adjuvant incomplet de Freund est incapable d'induire des CTL spécifiques de ce peptide, tandis que l'immunisation avec la lignée L210-P1A-B7 est efficace, comme attendue, pour obtenir des CTL anti-P1A fonctionnels, puisque capables de lyser une cible exprimant cet antigène.

Dans les mêmes conditions, la protéine de fusion Shiga P1A associée ou non à de l'adjuvant incomplet de Freund permet l'induction *ex vivo* de CTL anti-P1A : un pourcentage de lyse similaire à celui du contrôle positif est obtenu aux rapports effecteurs/cibles 50/1 et 25/1.

Cible P815

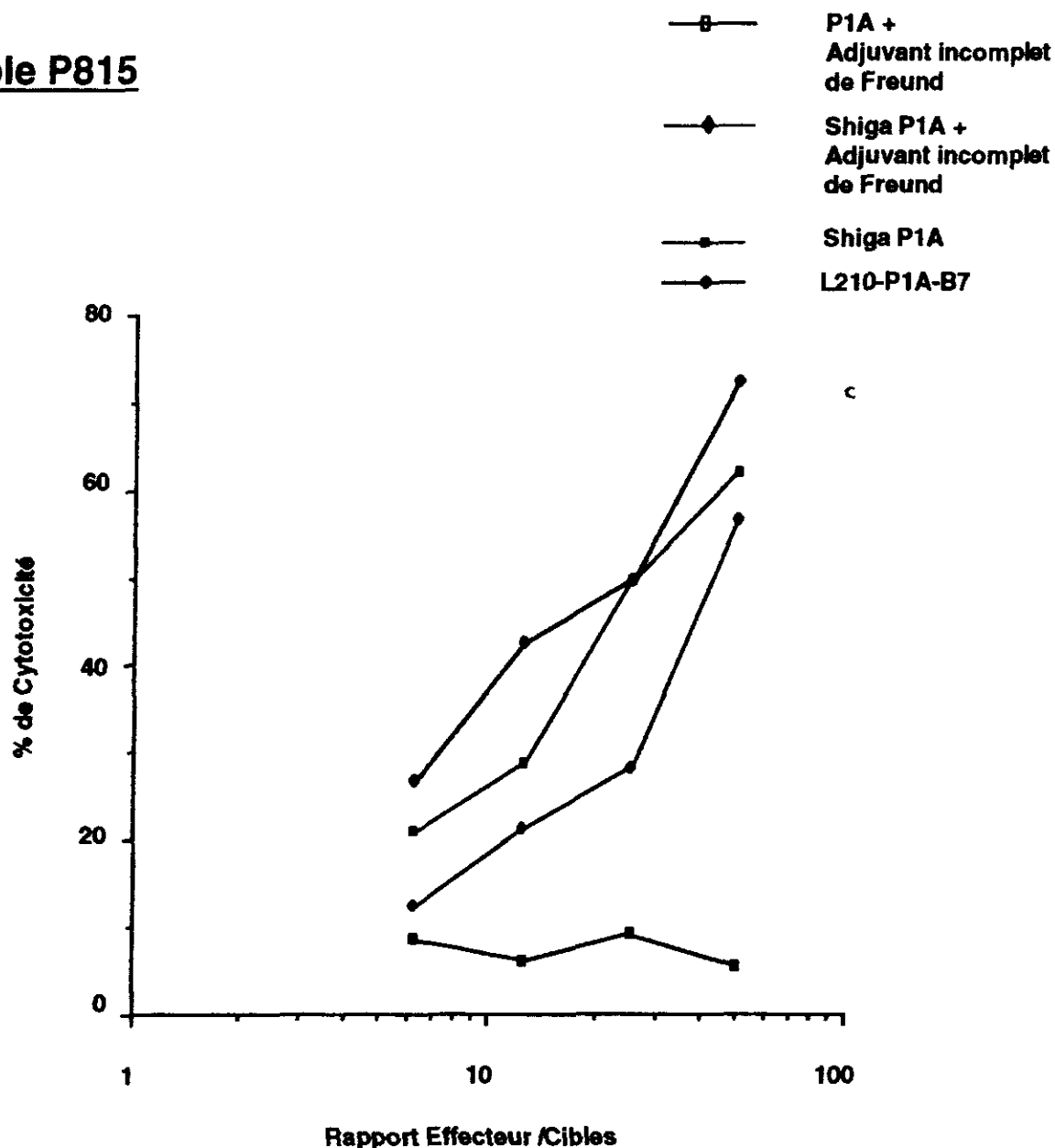


Figure 7 A : Induction d'une réponse CTL ex vivo par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par la protéine recombinante Shiga-P1A (cellules cibles P815 expriment le peptide P1A).

Les souris DBA2 sont immunisées en IP aux jours J0, J7, et J14 avec 40 µg de peptide P1A (100µl) + 100 µl d'adjuvant incomplet de Freund (—■—), 40 µg de Shiga-P1A (dilué dans 100 µl de PBS) + 100 µl d'adjuvant incomplet de Freund (—◆—), 40 µg de Shiga-P1A (suspendu dans 200 µl de PBS)(—●—) et 10⁶ cellules L210.P1A-B7 (suspendues dans 200 µl de PBS)(—▲—). Les cellules sont isolées de la rate à J28, stimulées in vitro pendant 4 jours avec les cellules L210.P1A-B7 irradiées (10000 Rad/min), en présence d'IL2 et mises en présence des cellules cibles à J32 pendant 4h. Les cellules effectrices sont testées pour leur activité cytotoxique à différents ratio sur les cellules P815 (A) et P1204 - variant négatif pour l'antigène P1A de P815 - (B) marquées au Cr51 après 4h d'incubation à 37°C. Le pourcentage de relargage spécifique du Cr51 est lu sur compteur β.

Cible P1-204

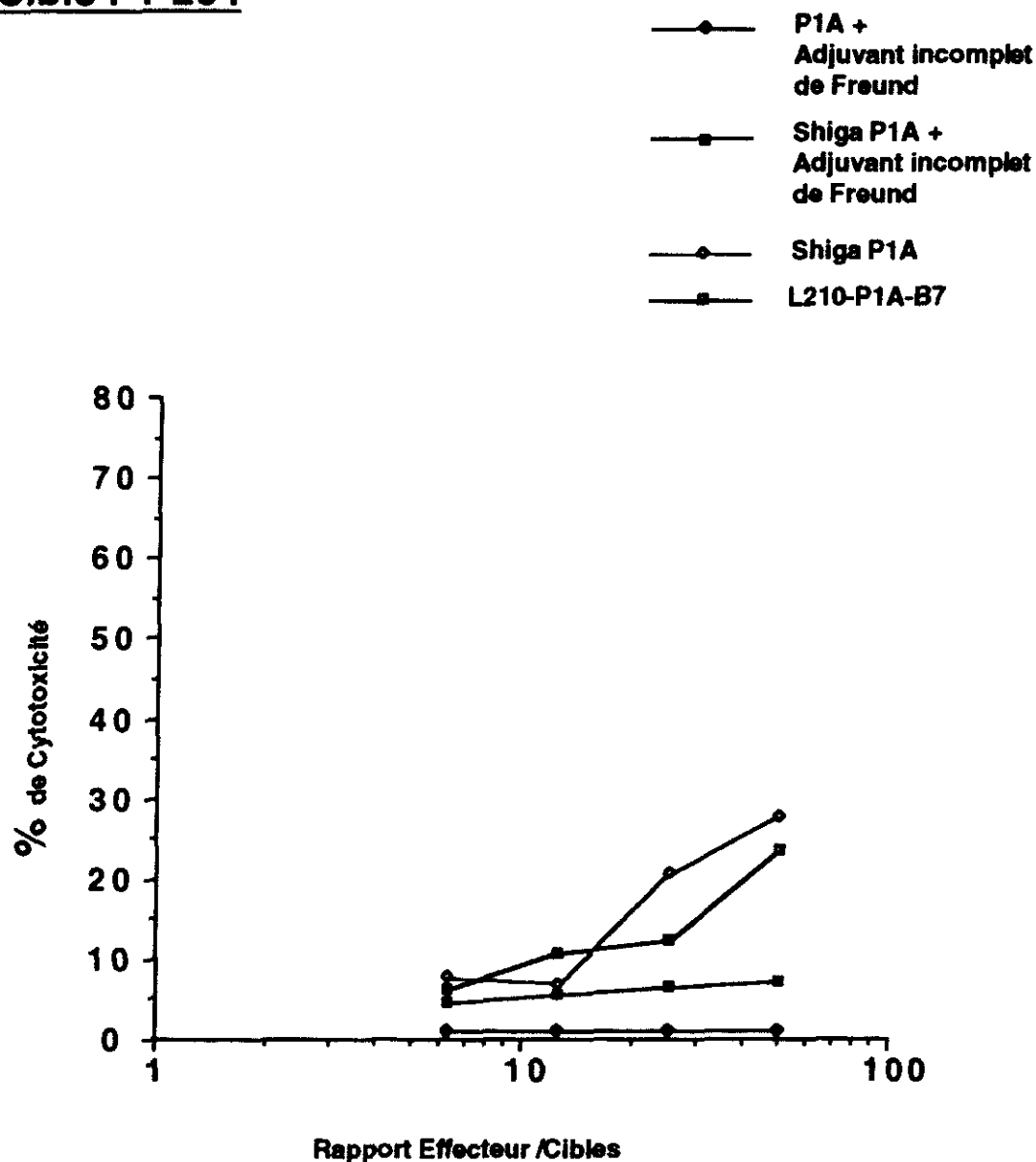


Figure 7 A : Induction d'une réponse CTL ex vivo par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par la protéine recombinante Shiga-P1A (cellules cibles P1204 n'expriment pas le peptide P1A).

Les souris DBA2 sont immunisées en IP aux jours J0, J7, et J14 avec 40 µg de peptide P1A (100µl) + 100µl d'adjuvant incomplet de Freund (◆), 40 µg de Shiga-P1A (dilué dans 100 µl de PBS) + 100 µl d'adjuvant incomplet de Freund (■), 40 µg de Shiga-P1A (suspendu dans 200 µl de PBS) (○) et 10⁶ cellules L210.P1A-B7 (suspendues dans 200 µl de PBS) (▲). Les cellules sont isolées de la rate à J28, stimulées in vitro pendant 4 jours avec les cellules L210.P1A-B7 irradiées (10000 Rad/min), en présence d'IL2 et mises en présence des cellules cibles à J32 pendant 4h. Les cellules effectrices sont testées pour leur activité cytotoxique à différents ratio sur les cellules P815 (A) et P1204 - variant négatif pour l'antigène P1A de P815 - (B) marquées au Cr51 après 4h d'incubation à 37°C. Le pourcentage de relargage spécifique du Cr51 est lu sur compteur β.

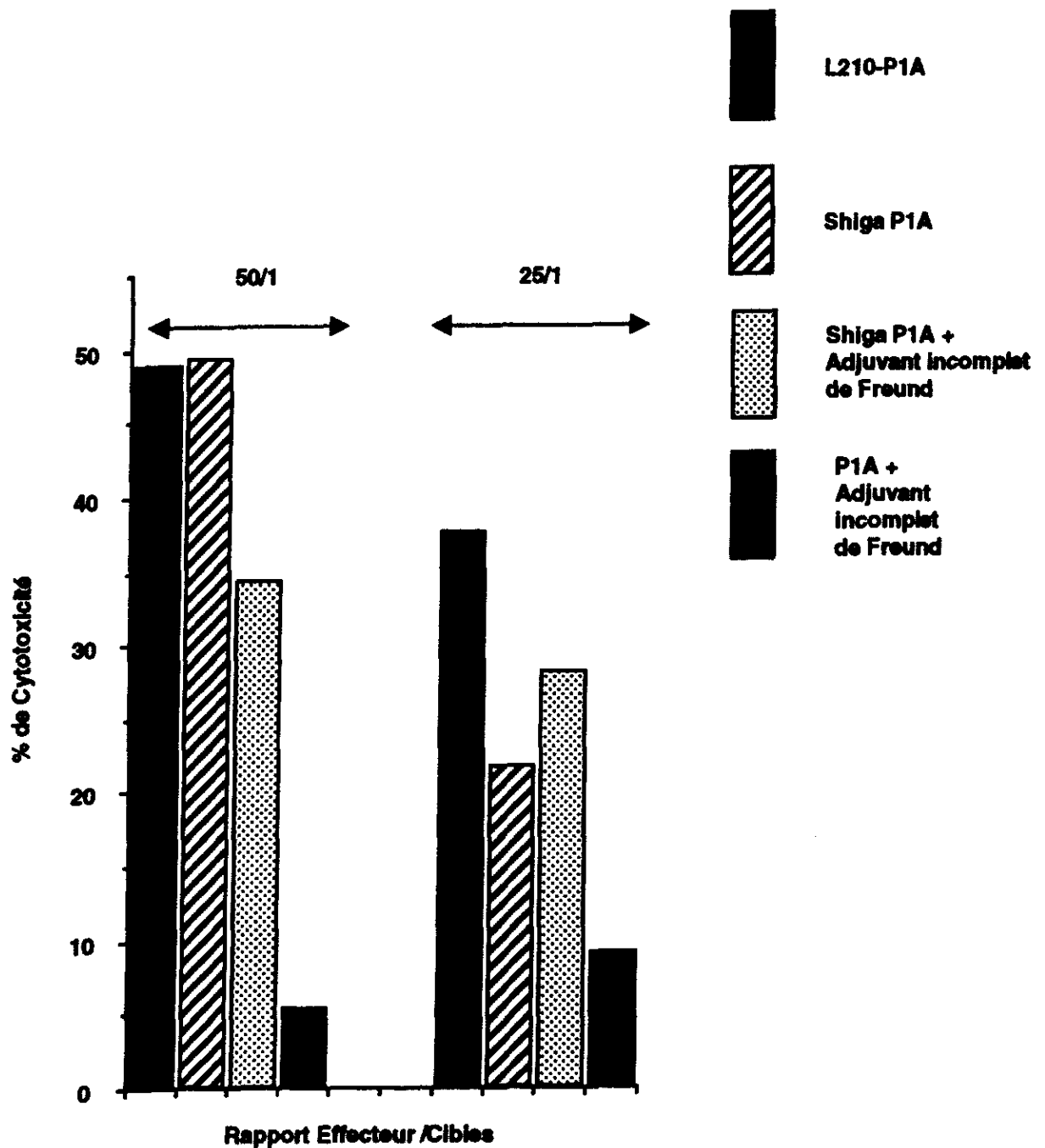


Figure 8 : Calcul expérimental de la réponse CTL spécifique de l'antigène P1A par immunisation avec l'antigène P1A vectorisé par le fragment B de Shiga.

Le pourcentage de lyse reflète la réponse CTL non spécifique de P1A obtenue avec la cible P1-204 est soustrait du pourcentage de lyse obtenue sur la cible P815 (Figure 7-8) afin d'évaluer la réponse CTL spécifique dirigée contre P1A.

TROISIEME PARTIE :
DISCUSSION

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

Au cours de ce travail nous avons montré que des cellules dendritiques sensibilisées avec une protéine de fusion constituée du fragment B de la toxine de Shigella et d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (SL8) pouvaient présenter ce peptide de manière restreinte par les molécules du CMH de classe I à un hybridome T anti-SL8.

Au contraire, l'incubation de cellules dendritiques avec l'ovalbumine native (contenant l'épitope SL8) ne permet pas la présentation de ce peptide à l'hybridome T anti-SL8. Ce résultat confirme d'autres travaux où le fragment B pouvait vectoriser un peptide tumoral et le cibler dans une voie de présentation restreinte par le CMH I (35).

Plus récemment un autre groupe indépendant a fusionné un épitope CD8 dérivé du virus influenza à une toxine " Shiga like " et démontré la possibilité de différents types cellulaires de présenter ce peptide de façon restreinte par le CMH I après internalisation de la protéine de fusion (36).

I. Mécanismes à l'origine du ciblage de peptides exogènes par le fragment B de la toxine de Shiga vers une voie de présentation CMH I restreinte

Dans une première expérience, nous nous sommes assurés que le " processing " de cette protéine de fusion (Shiga-SL8) ne s'effectuait pas dans le milieu extracellulaire en montrant que la fixation par la paraformaldéhyde des cellules avant leur sensibilisation par la protéine de fusion inhibait la présentation du peptide SL8 (Figure 3).

Le récepteur du fragment B étant un glycolipide, nous avons montré à l'aide d'un inhibiteur de la voie de biosynthèse des céramides, une relation entre l'expression de ce récepteur et la présentation du peptide SL8 par les molécules du CMH I lors d'exposition à la protéine de fusion Shiga-SL8 (Figure 5). Bien que l'on ne puisse pas exclure une action de cet inhibiteur de la biosynthèse de céramides sur une étape d'apprêtement de l'antigène, il semble que cette voie de présentation d'antigènes exogènes à des molécules du CMH

de classe I soit dépendante de la liaison du fragment B à son récepteur Gb3 membranaire.

Par ailleurs, aussi bien chez l'homme que chez la souris, une association a été observée entre l'expression de Gb3 sur un type cellulaire et la propriété de ce type cellulaire à présenter via le fragment B un peptide exogène de manière CMH I restreinte (Figure 1 et 2)(35).

D'autres modèles permettant la présentation restreinte par les molécules du CMH I de peptides dérivés de protéines exogènes (toxine bactérienne dérivée de *Bordetella Pertussis* ou de la toxine de *Bacillus anthracis*), n'ont pas souligné le rôle d'un récepteur membranaire (47,48). Lors des stratégies de présentation CMH I de protéines exogènes sous forme particulière (billes de latex, antigène sous forme d'aggrégats ou des pseudo particules virales recombinantes, antigènes sous forme particulière), l'internalisation s'effectue le plus souvent par phagocytose (11).

Cette présentation de peptides exogènes véhiculés par le fragment B via un récepteur membranaire constitue donc un mécanisme original de ciblage de protéines exogènes dans la voie cytosolique.

L'inhibition de la présentation antigénique dépendant du fragment B par la lactacystine, un inhibiteur de l'activité du protéasome, indique qu'un processing cytosolique via le protéasome est une étape nécessaire pour la présentation de peptides dérivés de protéines exogènes vectorisées par le fragment B. Ce passage cytosolique suggère aussi que la protéine de fusion Shiga-SL8 puisse sortir de la voie endosomale pour rejoindre la voie conventionnelle de présentation de peptides associés aux molécules du CMH I.

Deux principales voies de présentation de peptides dérivés de protéines exogènes ont été décrites dans la littérature.

L'une, initialement mise en évidence par Pfeifer *et al*, stipulant qu'après phagocytose de l'antigène, les peptides libérés dans les endosomes régurgiteraient à la surface de la cellule et s'associeraient aux molécules de classe I membranaire (49). Cette présentation était abolie par les inhibiteurs de l'activité lysosomale tandis que les inhibiteurs de la voie classique de présentation (lactacystine, bréfèldine) de peptides par les molécules du CMH I, n'interféraient pas avec cette présentation. Ce phénomène de régurgitation est aujourd'hui très controversé.

L'autre mécanisme décrit lors de phénomène de phagocytose ou de macropinocytose de protéines exogènes fait intervenir une fuite dans le cytosol de matériel antigénique à partir de phagolysosomes. Ces antigènes libérés rejoignent la voie traditionnelle de présentation des peptides par des molécules

du CMH I (50). Comme attendu, cette présentation n'est plus observée lors de l'emploi d'inhibiteurs de l'activité du protéasome (lactacystine) ou du transport de molécules entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Brefeldine). La présence des protéines TAP permettant le transport de peptides du cytosol au RE est également nécessaire.

Dans le cas des autres toxines utilisées comme vecteurs de polypeptides, le groupe de Berzofsky a montré que le "Lethal Factor" de la toxine dérivée de *Bacillus anthracis*, fusionné à un peptide dérivé de la gp120, permettait le ciblage de ce peptide dans une voie restreinte par le CMH I via un mécanisme impliquant le protéasome (51). La protéine TAP et le protéasome semblent également nécessaires à la capacité de la toxine dérivée de *Bordetella pertussis* de vectoriser des peptides vers le CMH I (47). Au contraire, la présentation de peptides restreints par le CMH I via l'exotoxine A de *pseudomonas* n'est pas inhibée par la bréfeldine et ne nécessite pas la présence de la protéine TAP (52).

II. Cellules présentant des peptides dérivés de protéines exogènes par des molécules du CMH I

Dans ce travail, nous avons montré qu'une lignée de cellules dendritiques était capable de présenter *in vitro*, de manière restreinte par le CMH I, des peptides dérivés d'une protéine de fusion constituée du fragment B de la toxine de *Shigella* et d'un peptide issu de l'ovalbumine. Nous n'avons pas obtenu de présentation du peptide SL8 de manière restreinte par le CMH I avec les quelques lignées de lymphocytes B et T (Fig 1-2 et résultats non montrés) que nous avons testés après leur sensibilisation par la protéine Shiga-SL8. Dans notre expérience, cette présentation est liée à l'expression de Gb3 sur les cellules présentatrices.

Chez l'homme les cellules dendritiques peuvent présenter des peptides exogènes de façon restreinte par le CMH I via le fragment B. Certaines lignées de lymphocytes B activées par l'EBV sont également efficaces pour ce type de présentation (35). Nous n'avons pas dans ce travail étudié des lymphocytes B à différents stades de différenciation et d'activation pour tenter d'expliquer cette contradiction apparente.

Aussi bien chez l'homme que chez la souris, les cellules dendritiques apparaissent donc comme une cible préférentielle pour le ciblage de peptides exogènes via le fragment B. En raison du rôle reconnu de ces cellules comme

présentatrices professionnelles d'antigènes, de nombreux auteurs ont développé des protocoles où des cellules dendritiques sont purifiées et cultivées *in vitro* puis sensibilisées avec des antigènes avant d'être réinjectées dans l'organisme (53). Cependant, ces protocoles de vaccination nécessitent une manipulation *ex vivo* et la lourde contrainte de travailler sur les cellules autologues du patient. Le ciblage préférentiel de ces cellules dendritiques par le fragment B permettrait d'éviter ces contraintes. La transposition *in vivo* du ciblage des cellules dendritiques par le fragment B semble cependant délicate (12h de contact avec les B3Z sont nécessaires à la reconnaissance, et la stimulation *in vitro* des splénocytes avec de l'IL2 est nécessaire avant le test CTL).

L'activité de l'adénylate cyclase, toxine dérivée de *Bordetella Pertussis*, ne semble pas restreinte à un type cellulaire puisqu'aussi bien des lymphocytes B et des lymphocytes T sont capables de présenter de manière restreinte par le CMH I des peptides dérivés de protéines exogènes via cette toxine (47).

Le "Lethal Factor" de l'*anthrax* ne cible pas préférentiellement des cellules dendritiques pour la vectorisation de peptides exogènes.

Ce routage préférentiel du fragment B de la toxine de *Shiga* vers des cellules dendritiques confère donc à cet outil vaccinal un certain avantage par rapport à l'utilisation de ces autres toxines.

III. Induction de lymphocytes T cytotoxiques après vaccination par le fragment B fusionné à un peptide antigénique

Après vaccination avec la protéine de fusion constituée du fragment B de la toxine de *Shiga* et du peptide P1A, des splénocytes de souris sont capables de lyser la lignée tumorale P815 exprimant cet antigène tumoral. La présence d'adjuvant incomplet de Freund ne semble pas augmenter cette activité (Figure 7). La spécificité de cette cytotoxicité est démontrée par l'utilisation d'une lignée P815 déficiente pour l'expression de l'antigène P1A.

Comme déjà observé par de nombreux groupes, l'administration du peptide P1A seul ou associé à de l'adjuvant incomplet de Freund est inefficace pour induire des CTL anti-P1A spécifiques (54). Le peptide P1A étant considéré comme un peptide peu immunogène, l'obtention de CTL anti-P1A dans ce système constitue donc un premier résultat significatif sur l'utilisation potentielle du fragment B comme outil vaccinal.

Ce résultat mérite d'être évidemment confirmé avec d'autres systèmes antigéniques.

D'autres méthodes consistant en l'administration de virus recombinants ou de plasmides avec l'ADNc de P1A ainsi que des particules virales hybrides contenant l'antigène P1A ont permis d'induire des CTL *in vivo* contre ce peptide (55,56). Néanmoins, l'utilisation chez l'homme de vaccin à ADN pose encore quelques problèmes éthiques liés à la possible intégration de ces séquences d'ADN dans le génome. Le risque d'atteintes auto-immunes par induction d'auto-anticorps anti-ADN nécessite une surveillance étroite de ces patients. La sensibilisation des cellules dendritiques avec l'antigène P1A s'est révélée inefficace, à l'inverse d'autres antigènes, pour induire des CTL probablement dû de la faible immunogénicité de l'antigène P1A (57). L'administration simultanée d'IL-12 à ces cellules dendritiques améliore l'efficacité de ce système (54).

La place du fragment B de la toxine de *Shiga* comme vecteur vaccinal par rapport à ces autres stratégies de vaccination doit être défini par des études cliniques comparatives utilisant des mêmes antigènes.

CONCLUSION

CONCLUSION

Pour expliquer et argumenter le rôle potentiel du fragment B de la toxine de *Shigella* comme outil vaccinal, nous avons démontré que des cellules dendritiques incubées avec des protéines recombinantes exogènes, associant le fragment B de la protéine de *Shiga* à un peptide dérivé de l'ovalbumine, étaient capables de présenter ce peptide de façon restreinte par le CMH I. Contrairement aux autres méthodes de transport d'antigène exogène vers une voie de présentation de classe I, qui impliquent une phase d'endocytose ou de phagocytose, nous avons montré que ce processus d'internalisation est récepteur dépendant. Quand l'expression de ce récepteur Gb3 est diminuée sur les cellules présentatrices, l'habilité de ces cellules à présenter un antigène exogène couplé au fragment B est perdue.

Ainsi, ce mécanisme récepteur dépendant offre différents avantages en terme de sensibilité et spécificité de cible cellulaire comparé aux autres approches vaccinales.

Une immunisation de souris à l'aide du fragment B couplé au peptide tumoral P1A, a permis l'induction de CTL contre ce peptide. Cette induction de CTL est observée même en absence d'adjuvant, ce qui distingue ce vecteur des autres toxines ou agents vecteurs étudiés et ce qui conforte une application clinique possible chez l'homme, où seuls quelques adjuvants sont autorisés. Comme il a été montré par d'autres groupes, l'immunisation du peptide P1A seul ou associé à de l'adjuvant incomplet de Freund n'entraîne aucune activité de CTL (46) et sa faible immunogénicité obère une stratégie d'immunisation avec des cellules dendritiques pulsées avec ce peptide visant à induire des CTL.

Ce travail montre que le fragment B de la toxine de *Shiga* représente un candidat attractif pour le développement de vaccin par son habilité à cibler des cellules dendritiques et sa capacité à induire des lymphocytes T spécifiques sans adjuvant.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Tartour, E., Dorval, T., Lee, R. S., and Fridman, W. H. L'immunothérapie dans le traitement des cancers. *Presse médicale*. 25, 1717-1722 (1996)
2. Burnet, F.M. Immune surveillance, Smith, Landy eds. Acad Press, New York.
3. Van der Bruggen, P., Traversari, P., Chomez, C., et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254, 1643-7 (1991)
4. Watanabe, T., Pukel, C.S., Takeyama, H., et al. Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2. *J. Exp Med.* 156, 1884-9 (1982)
5. Musiani, P., Modesti, A., Giovarelli, M., Cavallo, F., Colombo, M.P., Lollini, P.L. and Forni, G. Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity : a question of choice. *Immunol Today*. 18, 32-36 (1997)
6. Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1159-1166 (1994)
7. Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal M. C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., and Hercend, T. Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J. Clin. Invest.* 93, 1397-1402 (1994)
8. Sabzevari, H., Reisfeld, R. A. Human cytotoxic T-cells suppress the growth of spontaneous melanoma metastases in SCID/hu mice. *Cancer Res.* 53, 4933-4937 (1993)
9. Rock, K.L. A new foreign policy : MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today*. 17, 131-7 (1996)
10. Heemels, M. T., and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 463-491 (1995)
11. Raychaudhuri, S., and Rock, K.L. Fully mobilizing host defense : building better vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16, 1025-1031 (1998)
12. Marchand, M., Weynants, P., Rankin, E., Arienti, F., Belli, F., Cascinelli, N., Boulond, A., Vanwijck, R., Humblet, Y., Canon, J.-L., Laurent, C., Naeyaert, J.-M., Plagne, R., Deraemaeker, R., Knuth, A., Jäger, E., Brasseur, F., Herman, J., Coulie, P.G. and Boon, T. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int. J. Cancer.* 63, 883-885 (1995)

13. Tsang, K. Y., Zaremba, S., Nieroda, C. A., Zhu, M. Z., Hamilton, J. M., and Schlom. Generation of human cytotoxic T-cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 982-990 (1995)
14. Pan, Z.K., Ikonomidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D., and Paterson, Y. A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nature Med.* 1, 471-477 (1995)
15. Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz Hillel, A., Feldman, M., Berke, M., et Eisenbach, L. Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumor-associated antigen peptides. *Nature Med.* 1, 1179-1183 (1995)
16. Toes, R.E., Blom, R.J., Ofringa, R., Kast, W.M., and Melief, J.M. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. *J. Immunol.* 156, 3911-3918 (1996)
17. Minev, B.R., McFarland, B.J., Spiess, P.J., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. Insertion signal sequence fused to minimal peptides elicits specific CD8+ T-cell responses and prolongs survival of thymoma-bearing mice. *Cancer Res.* 54, 4155-4161 (1994)
18. Deres, K., Schild, H., Wiesmuller, K.H., Jung, G., and Rammensee, H.G. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature.* 342, 561-564 (1989)
19. Vitiello, A., Ishioka, G., Grey, H.M., Rose, R., Farness, P., Lafond, R., Yuan, L., Chisari, F.V., Furze, J., Bartholomeuz, R., et al. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans. *J. Clin. Invest.* 95, 341-349 (1995)
20. Faló Jr, L.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., and Rock, K.L. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nature Med.* 1, 649-653 (1995)
21. Greenstone, H.L., Nieland, J.D., De Visser, K.E., De Bruijn, M.L.H., Kirnbauer, R., Roden, R.B.S., Lowy, D.R., Kast, W.M., and Schiller, J.T. Chimeric papillomavirus virus like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 1800-1805 (1998)
22. Reis e Sousa, C., Germain, R.N. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp Med.* 182, 841-851 (1995)

23. Ciernik, I.F., Berzofsky, J.A., and Carbone, D.P. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J. Immunol.* 156, 2369-2375 (1996)
24. Letvin, N.L., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Perry, H.C., Davies, M.E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D.C., Lord, C.I., Handt, L.K., Liu, M.A., and Shiver, J.W. Potent, protective, anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9378-9383 (1997)
25. Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp Med.* 188, 1359-1368 (1998)
26. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Kenneth, R.L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class-I and class-II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723-2730 (1997)
27. Nestlé, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med.* 4, 328-332 (1998)
28. Stein, P.E., Boodhoo, A., Tyrrell, G.J., Brunton, J.L., and Read R.J. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from E.coli. *Nature.* 355, 748-750 (1992)
29. Johannes, L., Goud, B. Surfing on a retrograde wave : how does Shiga toxin reach the endoplasmic reticulum ?. *Trends Cell Biol.* 8, 158-162 (1998)
30. Van Setten, P. A., Monnens, L. A., Verstraten, R. G., van den Heuvel, L. P., and van Hinsberg, V. W. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* 88, 174-183 (1996)
31. Sandvig, K., and van Deurs, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76, 949-966 (1996)
32. Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H., and van Deurs, B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature.* 358, 510-512 (1992)
33. Johannes, L., Tenza, D., Antony, C., and Goud, B. Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* 272, 19554-19561 (1997)
34. Plemper, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D. H. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* 388, 891-895 (1997)

35. Lee, R.-S., Tartour, E., Van der Bruggen, P., Vantomme, V., Goud, B., Fridman, W.-H., and Johannes, L. Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumor antigen fused to the B-fragment of Shiga toxin. *Eur. J. Immunol.* 28, 1-10 (1998)
36. Noakes, K.L., Teisserenc, H.T., Lord, J.M., Dunbar, P.R., Cerundolo, V., and Roberts, L.M. Exploiting retrograde transport of Shiga-like toxin 1 for delivery of exogenous antigens into the MHC class I presentation pathway. *FEBS Letters.* 453, 95-99 (1999)
37. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185, 317-328 (1997)
38. Uyttenhove C, Maryanski J, Boon T. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J. Exp. Med.* 157, 1040-1052 (1993)
39. Gajewski TF, Renaud JC, Van Pel A, Boon T. Costimulation with B7-1, IL-6, and IL-12 is sufficient for primary generation of murine antitumor cytolytic T lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* 154, 5637-48 (1995)
40. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 6020-6024 (1992)
41. Jones B, Tite JP, Janeway CA. Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered cytotoxicity of L3T4-positive, IA-restricted T cell clones. *J. Immunol.* 136, 348-356 (1986)
42. Sassano M, Granucci F, Seveso M, Marconi G, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P. Molecular cloning of a recombinant retrovirus carrying a mutated envAKR-mycMH2 fusion gene immortalizing cells of the monocytic-macrophage lineage. *Oncogene.* 9, 1473-1477 (1994)
43. Puri, A., Hug, P., Munoz-Barroso, I., and Blumenthal, R. Human erythrocyte glycolipids promote HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion of CD4+ cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, 219-225 (1998)
44. Fenteany, G., Schreiber, S.T. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273, 8545-8548 (1998)
45. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 923-930 (1996)

46. Brandle D, Bilsborough J, Rulicke T, Uyttenhove C, Boon T, Van den Eynde BJ. The shared tumor-specific antigen encoded by mouse gene P1A is a target not only for cytolytic T lymphocytes but also for tumor rejection. *Eur.J. Immunol.* 28, 4010-4009 (1998)
47. Guermonprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullman, A., Leclerc, C. Direct delivery of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol.* 162, 1910-1916 (1999)
48. Ballard, J.D., Doling, A.M., Beauregard, K., Collier, R.J., Starnbach, M.N. Anthrax toxin-mediated delivery in vivo and in vitro of a cytotoxic T-lymphocyte epitope from ovalbumin. *Infect Immun.* 66, 615-619 (1998)
49. Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., Harding, C.V. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature.* 361, 359-362 (1993)
50. Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* 15, 821-850 (1997)
51. Goletz, T.J., Klimpel, K.R., Arora, N., Leppla, S.H., Keith, J.M., Berzofsky, J.A. Targeting HIV proteins to the major histocompatibility complex class I processing pathway with a novel gp120-anthrax toxin fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 12059-12064 (1997)
52. Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Liu, M.A. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol.* 24, 1590-1596 (1994)
53. Banchereau, J., Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245-252 (1998)
54. Fallarino, F., Uyttenhove, C., Bonn, T., Gajewski, T.F. Improved efficacy of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12. *Int J Cancer.* 80, 324-333 (1999)
55. Rosato, A., Zambon, A., Milan, G., Ciminale, V., D'Agostino, D.M., Macino, B., Zanovello, P., Collavo, D. CTL response and protection against P815 tumor challenge in mice immunized with DNA expressing the tumor-specific antigen P815A. *Hum Gene Ther.* 8,1451-1458 (1997)
56. Warnier, G., Duffour, M. T., Uyttenhove, C., Gajewski, T. F., Lurquin, C., Haddada, H., Perricaudet, M., and Boon, T. Induction of a cytolytic T-cell response in mice with a recombinant adenovirus for tumor antigen P815A. *Int. J. Cancer.* 67, 303-310 (1996)
57. Grohmann, U. Bianchi, R., Ayroldi, E., Belladonna, M.L., Surace, D., Fioretti, M.C., Puccetti, P. A tumor-associated and self antigen peptide presented by dendritic cells may induce T cell anergy in vivo, but IL-12 can prevent or revert the anergic state. *J Immunol.* 158, 3593-3602 (1997)

ANNEXE

The B Subunit of Shiga Toxin Fused to a Tumor Antigen Elicits CTL and Targets Dendritic Cells to Allow MHC Class I-Restricted Presentation of Peptides Derived from Exogenous Antigens¹

Nacilla Haicheur,* Emmanuelle Bismuth,[†] Sophie Bosset,* Olivier Adotevi,* Guy Warnier,[‡] Valérie Lacabanne,[§] Armelle Regnault,[§] Catherine Desaynard,[†] Sebastian Amigorena,[§] Paola Ricciardi-Castagnoli,[¶] Bruno Goud,[†] Wolf H. Fridman,* Ludger Johannes,^{2†} and Eric Tartour^{2,3*}

Conclusion

Mémoire de Mme **Sophie Bosset** pour l'obtention du titre de Docteur Vétérinaire de la Faculté de Médecine de Lyon.

« Etude d'un modèle de présentation peptidique via le CMH de classe I en vue de vaccination anti-tumorale : utilisation de peptides fusionnés au fragment B de la toxine de *Shigella* »

Dans une première partie bibliographique est démontrée l'importance de l'immunité cellulaire dans le contrôle des tumeurs, et ses principaux aspects sont décrits, tels que la nature des antigènes tumoraux et les mécanismes d'évasion immune.

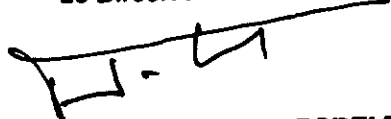
La présentation aux lymphocytes T des antigènes exogènes par l'intermédiaire des molécules du CMH I est rappelée de façon à mettre en avant les axes essentiels d'analyse de ce phénomène. Les principales stratégies employées à cet effet sont décrites et comparées.

Dans une seconde partie expérimentale sont présentées 2 séries d'expériences dans des modèles de présentation antigénique restreinte au CMH I chez la souris. Ces expériences rendent compte de l'immunité de 2 protéines issues de la fusion de peptides d'intérêt avec Shiga, le fragment B de la toxine de *Shigella* :

- une première série concerne la présentation du peptide SL8 issu de l'ovalbumine. Plusieurs études sont exposées, faisant appel à une lignée lymphocytaire spécifique de ce peptide, et à plusieurs conditions expérimentales (dose, inhibiteur), afin de démontrer la translocation du peptide -fusion dans le cytoplasme après reconnaissance par le récepteur Gb3 et son expression associée au CMH de classe I.
- une deuxième série concerne la mise en évidence chez la souris de splénocytes doués de capacités cytotoxiques spécifiques après immunisation par le peptide fusion P1A-fragment B de la toxine de *Shigella*.

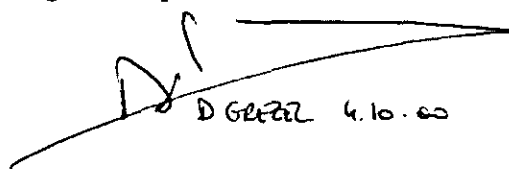
Vu :

Le directeur de thèse
L'ENVL Le Directeur - Assesseur



Professeur Guy CHANTEGRELET

L'enseignant responsable



D GERARD 4.10.00

Le Président de l'Université
Claude Bernard Lyon I

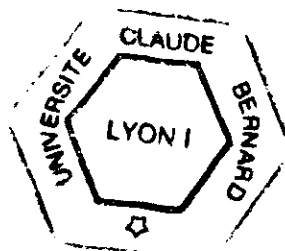
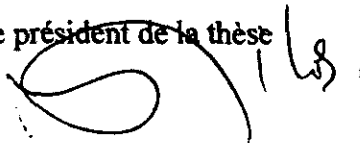


M. DECHAVANNE

26 OCT. 2000

Vu et permis d'imprimer

Le président de la thèse



BOSSET SOPHIE - Etude d'un modèle de présentation peptidique via le CMH de classe I en vue de vaccination anti-tumorale : utilisation de peptides fusionnés au fragment B de la toxine de *Shigella* .

RESUME :

Les virus constituent encore aujourd'hui les vecteurs de référence utilisés dans des protocoles de vaccination pour cibler des antigènes exogènes dans une voie de présentation restreinte par le CMH I. Le fragment B de la toxine de *Shigella* permet également la translocation de protéines exogènes dans une voie non endosomale.

Ce travail montre que des cellules dendritiques incubées avec une protéine de fusion constituée du fragment B et d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (SL8), sont capables de présenter ce peptide de manière restreinte par les molécules du CMH I à un hybridome T anti-SL8. L'analyse du mécanisme de cette présentation met en évidence un rôle du récepteur membranaire Gb3 du fragment B de Shiga dans l'internalisation de la protéine de fusion et sa capacité à cibler le peptide dans une voie de présentation restreinte par le CMH I. La présentation du peptide SL8 vectorisé par le fragment B de Shiga est inhibée par la lactacystine, un inhibiteur spécifique du protéasome.

L'emploi de ce vecteur couplé à un peptide tumoral P1A permet l'induction de lymphocytes T cytotoxiques contre ce peptide lors d'un protocole d'immunisation de souris. Ce travail renforce donc l'intérêt du fragment B de la toxine de *Shigella* comme vecteur et adjuvant de vaccination.

MOTS CLES :

Vaccination anti-tumorale, Shiga toxine, Cytotoxicité lymphocytaire, CMH I,
Ciblage, Apprêtement, *Shigella*, Fragment B.

JURY :

Président :

Monsieur le Professeur NICOLAS

1^{er} Assesseur :

Madame le Docteur GREZEL

2^{ème} Assesseur :

Monsieur le Professeur MAGNOL

Invité :

Monsieur le Docteur DEVAUCHELLE

DATE DE SOUTENANCE :

17 Novembre 2000