

Lymphocytes T CD4 cytotoxiques : Analyse d'un nouveau candidat pour l'immunothérapie des tumeurs humaines

Rapport 3^{ème} année

Amélie Cachot, PhD

Bien que les cellules T CD8 aient été jusqu'à présent les principales cibles de l'immunothérapie contre le cancer, les cellules T CD4 sont reconnues comme jouant un rôle clé dans l'immunité anti-tumorale, et ce principalement en raison de leurs fonctions auxiliaires. Les cellules T CD4 polarisées Th1 infiltrant les tumeurs ont été associées à un bon pronostic dans de nombreuses tumeurs, tandis que l'infiltration par les cellules Th2, Th17 et T CD4 régulatrices a été associée à un mauvais pronostic, à quelques exceptions près. Fait intéressant, un sous-ensemble de cellules T CD4 avec un potentiel cytolytique a été décrit dans le contexte de certaines infections virales. Cependant, l'existence et la pertinence des lymphocytes T CD4 cytotoxiques dans l'immunité anti-tumorale restent largement inexplorées.

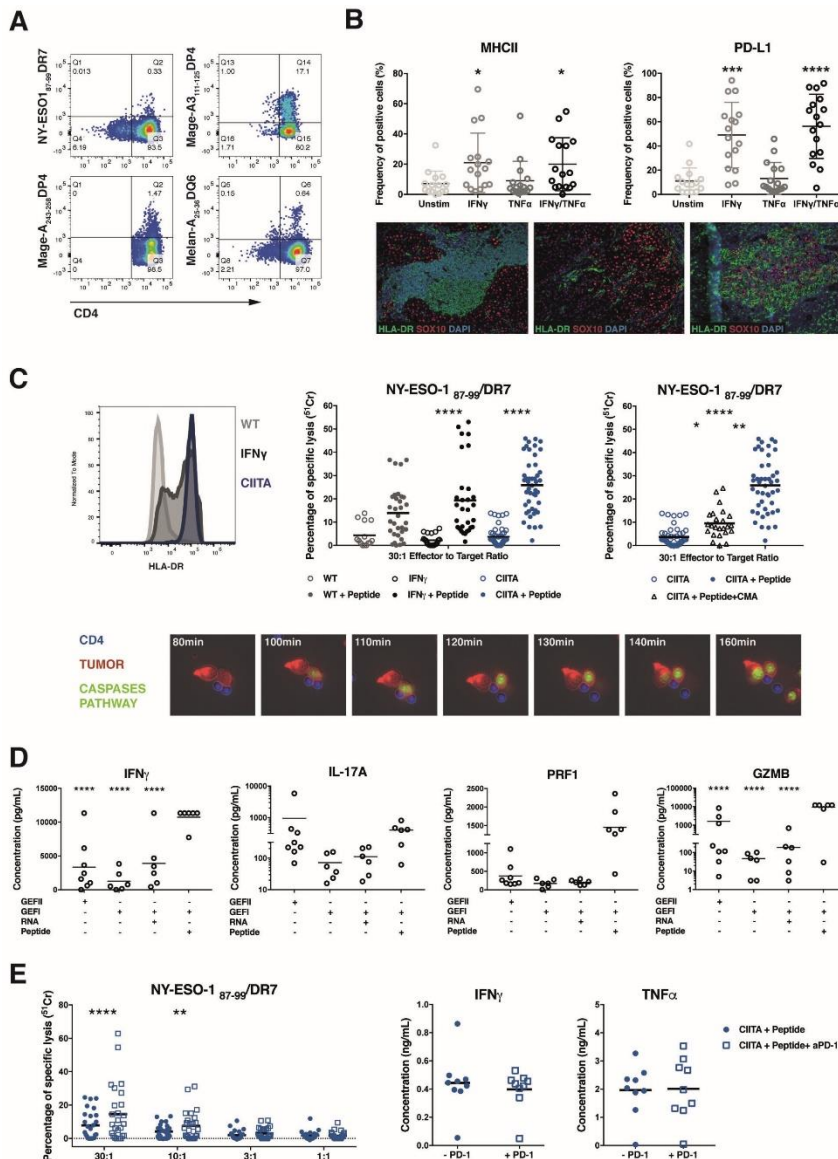
Nous avons établi, en collaboration avec la Tetramer Core Facility de l'Université de Lausanne, une technologie de multimères peptidiques-CMH de classe II améliorées, permettant la détection et l'expansion de lymphocytes T CD4 spécifiques à divers antigènes tumoraux rares provenant d'échantillons de sang et de tissus périphériques de patients cancéreux (Figure 1A). L'interaction potentielle et donc l'activité cytolytique inhérente des lymphocytes T CD4 contre les tumeurs devraient être dépendantes de l'expression du CMH de classe II à leur surface. Des expériences *in vitro* utilisant des molécules pro-inflammatoires sur des lignées de mélanome ont démontré une augmentation significative de l'expression du CMH de classe II après traitement à l'IFN γ dans la plupart des lignées. Le marquage de sections de mélanomes a révélé différents modèles d'expression du CMH de classe II directement *in situ*, avec une absence d'expression sur les cellules tumorales dans les « tumeurs froides » et une expression variable dans les « tumeurs chaudes », selon les patients. Ces résultats soulignent la nécessité de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier d'immunothérapies incluant les lymphocytes T CD4 spécifiques aux antigènes (Figure 1B).

Lors d'essais de reconnaissance tumorale utilisant des clones de lymphocytes T CD4 NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7 avec des cellules tumorales titrées (type sauvage, prétraitées avec IFN γ ou transduites avec CIITA et donc surexprimant CMH de classe II), nous avons observé une activité cytotoxique directe et dépendante de granzymes contre les tumeurs (figure 1C). De plus, conjointement à la sécrétion d'effecteurs classiques tels que la perforine et les granzymes, les clones de cellules T CD4 cytolytiques NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7 sécrètent également de l'IFN γ et de l'IL-17A, ce qui suggère un enrichissement des cellules T CD4 cytolytiques au sein des cellules T CD4 polarisées vers un phénotype Th1/Th17 (Figure 1D).

Un criblage de marqueurs candidats potentiels définissant cet ensemble de lymphocytes T CD4 cytolytiques a révélé une expression concomitante de PD-1 et de SLAMF7 avec des molécules liées à une capacité cytolytique. En interrogeant des données de séquençage d'ARN monocellulaire provenant de cellules T infiltrant la tumeur (collaboration avec le Prof. Gfeller, département d'oncologie, UNIL), nous avons confirmé la présence simultanée de transcrits de molécules cytotoxiques et de PD-1 dans des cellules T CD4 résidant dans des tumeurs humaines, plaçant ainsi pour leurs pertinences fonctionnelles *in vivo*.

De plus, l'inhibition *in vitro* de l'axe PD-1/PD-L1 semble libérer la capacité cytolytique des cellules T CD4 spécifiques de la tumeur (Figure 1E), alors que ce traitement ne montre aucun impact sur la sécrétion de cytokines. Ces observations soulignent la pertinence synergique et translationnelle de la combinaison d'immunisation peptidique / transfert de cellules adoptives spécifiques de lymphocytes T CD4 cytolytiques avec le blocage de points de contrôle immunitaire pour déclencher une réponse des lymphocytes T CD4 cytolytiques contre le cancer.

Illustration



Légende: Évaluation de la capacité cytolytique des lymphocytes T CD4 spécifiques à des antigène tumoraux.

(A) **Détection de cellules T CD4 spécifiques à divers antigènes en utilisant la technologie des multimères peptidiques - CMH de classe II.** Exemples représentatifs de divers marquages avec des multimères peptidiques - CMH de classe II de lymphocytes T CD4 spécifiques à NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7, Mage-A3₁₁₁₋₁₂₅/DP4, Mage-A3₂₄₃₋₂₅₈/DP4 et Melan-A₂₅₋₃₆/DQ6, et provenant de patients atteints de mélanome après un cycle de stimulation *in vitro*.

(B) **Évaluation de l'expression de CMH de classe II et de PD-L1 sur des lignées tumorales de mélanome et des sections de mélanome primaire.** Dix-neuf lignées de cellules tumorales de mélanome ont été traitées avec de l'IFN γ et/ou du TNF α pendant 48 heures *in vitro* avant l'analyse par cytométrie en flux (panneau supérieur). Exemples représentatifs d'immunofluorescence réalisés sur trois cas de mélanome. Les coupes tumorales ont été marquées avec DAPI (bleu), SOX10 (rouge) et un anticorps anti-CMH de classe II (vert), en utilisant le système de visualisation d'images Ventana Discovery du système Multispectral Vectra 3.0 (panneau inférieur).

(C) **Évaluation du potentiel cytolytique des lymphocytes T CD4 NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7 contre les lignées tumorales.** Résumé de tests standard de lyse cellulaire au chrome 51, réalisés avec des lignées tumorales non manipulées (WT, gris), traitées à l'IFN γ (noir) ou transduites avec CIITA (bleu), pulsées ou non avec un peptide spécifique (points remplis et vides, respectivement) et mis en culture avec des clones de lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène (panneau de gauche). Résumé de la lyse spécifique obtenue par l'inhibition de la perforine (panneau de droite). Séquence d'images illustrant le potentiel lytique des lymphocytes T CD4 NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7 contre des cellules tumorales. Les cellules T CD4 ont été marquées au CFSE violet (bleu), les lignées tumorales au PKH26 (rouge) et l'activation des voies de caspases 3/7 au FITC (vert). Les images ont été prises toutes les 10 minutes à l'aide d'un microscope confocal (panneau inférieur).

(D) **Résumé de la sécrétion de molécules apparentées à la cytotoxicité des clones de lymphocytes T CD4 NY-ESO-1₈₇₋₉₉/DR7 après reconnaissance de la tumeur.** Les clones de cellules T CD4 spécifiques de l'antigène ont été co-cultivés avec des lignées tumorales présentant une expression endogène de NY-ESO-1 (GEFII), électroporées (factice ou ARN NY-ESO-1) ou pulsées avec le peptide (GEFI). La sécrétion d'IFN γ , IL-17A, PRF1 et GZMB a été mesurée par la technologie LEGENDplex après 24 heures.

(E) **Amélioration de la capacité cytolytique de divers lymphocytes T CD4 spécifiques d'un antigène par le blocage de l'axe PD-1/PD-L1.** (A) Résumé de tests standard de lyse cellulaire au chrome 51, menés avec des lignées de cellules tumorales cibles transduites avec CIITA, pulsées avec un peptide spécifique en présence ou en absence de Nivolumab et co-incubées avec des clones de lymphocytes T CD4 spécifiques (panneau de gauche). Résumé de la sécrétion de cytokines réalisée avec des lignées de cellules tumorales cibles transduites avec CIITA, puis pulsées avec un peptide spécifique en présence ou en absence de Nivolumab et co-incubées avec des clones de cellules T CD4 spécifiques. La sécrétion d'IFN γ et de TNF α a été mesurée par ELISA après 24 heures (panneau de droite).