

PRODUCTION DE GRADE CLINIQUE DE LYMPHOCYTES T ANTI-ADENOVIRUS A DES FINS D'IMMUNOTHERAPIE CELLULAIRE ADOPTIVE APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES.

AÏSSI-ROTHÉ L, DECOT V, STOLTZ JF, BENSOUSSAN D.

Introduction

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH), s'accompagne d'un déficit immunitaire cellulaire et humoral plus ou moins prolongé. Cette immunodépression est à l'origine d'un grand nombre d'infections. Parmi celles-ci, les infections virales et en particulier celles dues à l'adénovirus (ADV) constituent un défi particulièrement important, peu de molécules étant actives à leur rencontre en l'absence de reconstitution immunitaire. L'incidence des infections à ADV varie de 5 à 21% chez les adultes et de 20 à 80 % chez les enfants. La mortalité peut atteindre 60 voire 73%. Les traitements anti-viraux comme le cidofovir, molécule anti-virale à large spectre la plus largement utilisée, semblent présenter une efficacité relative lorsque le patient ne présente pas d'immunité spécifique anti-ADV. De plus, leurs toxicités (notamment rénale) rendent leur utilisation difficile.

En l'absence d'efficacité du Cidofovir, aucune alternative thérapeutique ne peut être proposée à ce jour face à une charge virale ADV augmentée et en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique, ce qui peut conduire au décès du patient. C'est pourquoi, nous souhaitons initier la production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV à partir de cellules du donneur (leukaphérèse) à l'aide d'une technique rapide GMP afin de proposer une alternative thérapeutique aux patients en échec de traitement par Cidofovir.

De nombreux arguments laissent à penser que l'immunothérapie cellulaire adoptive est une alternative thérapeutique efficace. Chakrabarti *et al* ont montré que la lymphopénie est un facteur de risque majeur de développer une infection à adénovirus (Chakrabarti *et al*, 2002).

L'objectif est de développer une technique de production de lymphocytes T spécifiques anti-adénovirus à visée thérapeutique. Ces lymphocytes T spécifiques, isolés à partir des cellules du donneur permettent de restaurer une défense anti-ADV chez le receveur.

Matériel et Méthode

Des cellules mononucléées (CMN) de sept donneurs sains, préalablement testés pour leur réponse cellulaire anti-ADV (Elispot IFN- γ), sont séparées sur gradient de densité après prélèvement puis stimulées par un pool de peptides synthétiques de la protéine Hexon de l'ADV5 (PepTivator-ADV5, Miltenyi Biotec, Allemagne) pendant 6 heures. Les cellules sécrétant de l'IFN- γ sont ensuite sélectionnées sur CliniMACS en utilisant le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Une technique similaire a été précédemment publiée par l'équipe de Feuchtinger *et al*, utilisant comme antigène de stimulation la protéine Hexon de l'ADV2 qui à ce jour n'est pas de grade clinique (Feuchtinger *et al*, 2004).

Les CTL isolées sont mises en culture en présence d'IL-2 et de cellules irradiées de la fraction négative, afin de réaliser des contrôles qualités fonctionnels. Lorsque les CTL sont destinées à être réinjectées aux patients, cette technique ne comprend pas d'étape d'amplification des lymphocytes T spécifiques *in vitro* avant réinjection contrairement à beaucoup de protocoles cliniques de production de CTL anti-virales.

Résultats

Tous d'abord, nous avons comparé la capacité stimulante du pool de peptides de l'ADV5 avec celle de la protéine Hexon de l'ADV2, antigène utilisé par l'équipe de Feuchtinger. Nous avons observé une sécrétion d'IFN γ significativement plus faible avec le pool de peptides. Cependant, cette réponse est variable selon les patients, certains présentant une meilleure réponse au pool de peptides. De plus, compte tenu de l'absence de restriction HLA d'un pool de peptides contrairement à un peptide unique et de la synthèse selon les normes GMP de ce pool par rapport à la protéine Hexon produite sur lignée tumorale Hep2, le pool de peptides de l'ADV5 s'avère être un antigène de stimulation très intéressant pour la production de CTL anti-ADV.

Après immuno-sélection, une moyenne de $1.01 \pm 0.84 \times 10^6$ de CMN totales est obtenue. Les CTL anti-ADV sont majoritairement CD4+ (moyenne = $56\% \pm 5.59\%$, rendement = $51\% \pm 32.43\%$) mais aussi CD8+ (moyenne = $42\% \pm 27\%$, rendement = $56\% \pm 39.3\%$). Après amplification, la capacité des CTL amplifiées à sécréter de l'IFN γ et à proliférer après re-stimulation par le PepTivator ADV5 Hexon est confirmée.

Une forte cytotoxicité des CTL amplifiées est observée contre les cellules dendritiques autologues (10 :1) chargées avec du lysat viral d'ADV2 ou d'ADV5 ou contre des blastes PHA chargés avec le PepTivator-ADV5 alors qu'une cytotoxicité très faible est observée contre les cellules cibles non chargées.

Enfin, nous observons une diminution de 1.27 Log de l'alloréactivité des CTL vis-à-vis de PBMC de donneurs sains HLA différents, comparée à celle des PBMC avant sélection.

Conclusion

Nous avons pu montrer que la production de lymphocytes T anti-ADV en respectant les GMP (Good Manufacturing Practice) était possible grâce à l'utilisation d'un pool de peptides synthétiques. Cette technique rapide, de grade clinique permet de sélectionner des CTL anti-ADV efficaces et dépourvues de toxicité *in vitro*, pré-requis à l'élaboration d'un protocole clinique oligocentrique.