

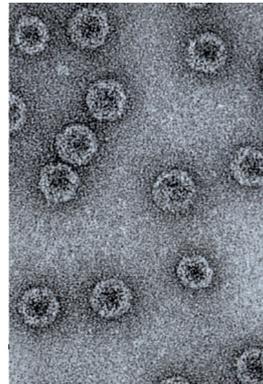
> L'auto-vaccination est une procédure qui vise à offrir une alternative immunologique à l'inactivation génique afin d'étudier le rôle de médiateurs, tels que des interleukines. Elle vise également le traitement potentiel de maladies dans lesquelles la production inappropriée de ces protéines inflammatoires joue un rôle déterminant. Elle est basée sur l'administration d'un vaccin comprenant la protéine autologue cible modifiée de manière à contenir des déterminants étrangers ; ceux-ci permettront d'apporter l'aide de cellules T auxiliaires à des précurseurs de lymphocytes B producteurs d'anticorps auto-réactifs. Nous décrivons ici les principes de cette auto-vaccination et les principaux résultats obtenus par divers auto-vaccins, ainsi que par des anticorps monoclonaux murins contre des protéines murines développés grâce à cette méthode. <

Buts et principe de l'auto-vaccination

Une production excessive ou inappropriée d'interleukines (IL) joue un rôle causal dans des maladies inflammatoires ou allergiques ; c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde avec l'IL-1 β [1] et le TNF- α (*tumor necrosis factor α*) [2], et dans l'asthme avec l'IL-13 [3]. Une manière relativement aisée de contrecarrer les effets néfastes de ces dérèglements est de mobiliser le système immunitaire de l'hôte par le biais d'une auto-vaccination. Cette approche peut être appliquée chez les animaux de laboratoire pour étudier le rôle physiologique ou l'implication pathologique d'une cytokine particulière. L'auto-vaccin constitue donc une alternative à l'inactivation génique, certes moins complète, mais plus aisée et plus modulable que celle-ci. De plus, chez la souris, elle permet d'obtenir des anticorps monoclonaux dont l'utilisation *in vivo* peut être prolongée indéfiniment sans induire de réponse immunitaire, inévitable lors de l'utilisation d'anticorps xénogéniques.

Auto-vaccins Une alternative immunologique à l'inactivation génique

Catherine Uyttenhove, Jacques van Snick



Institut Ludwig pour la recherche sur le cancer et unité de génétique cellulaire, Institut de Duve, Université catholique de Louvain, 74 avenue Hippocrate, 1200 Bruxelles, Belgique.
catherine.uyttenhove@bru.licr.org
jacques.vansnick@bru.licr.org

Au vu des connaissances actuelles, l'auto-vaccination se base sur les principes suivants. Il est bien établi que l'activation d'un lymphocyte B immature requiert l'aide d'un lymphocyte T. Cependant, les lymphocytes T auto-réactifs sont éliminés de manière très efficace par sélection négative intrathymique [4]. Ceux qui échappent à ce processus sont maintenus sous contrôle par plusieurs types de cellules T régulatrices périphériques (Treg et Tr₁) [5]. Pour les lymphocytes B auto-réactifs, il existe également plusieurs processus capables de les inactiver, tels que la délétion par apoptose de lymphocytes B de haute affinité pour des antigènes du soi [6], le réarrangement de locus de chaînes légères diminuant leur affinité [7], et l'anergie qui permet leur persistance dans un état non fonctionnel [8]. Cependant, l'absence de production d'auto-anticorps découle principalement d'une absence d'aide appropriée de lymphocytes T. Dès lors, si à l'antigène autologue reconnu par un lymphocyte B immature, on adjoint par couplage chimique ou manipulation génétique une séquence protéique étrangère, le complexe capturé par l'immunoglobuline de surface sera en partie internalisé, et des peptides dérivés de la protéine étrangère seront présentés par le lymphocyte B auto-réactif. Cette présentation antigénique, trompeuse ou illicite, contourne donc l'absence de T auto-réactifs puisque des lymphocytes T reconnaissant les peptides étrangers fourniront l'aide requise (Figure 1).

Survol historique et méthodologique de l'auto-vaccination

Auto-vaccins protéiques

La première approche de l'auto-vaccination est le croisement d'espèce : une protéine hétérologue peut, dans certains cas, entraîner la production d'anticorps qui présentent une réaction croisée avec la protéine autologue équivalente. Cette réaction est cependant imprévisible, ce qui limite évidemment son efficacité.

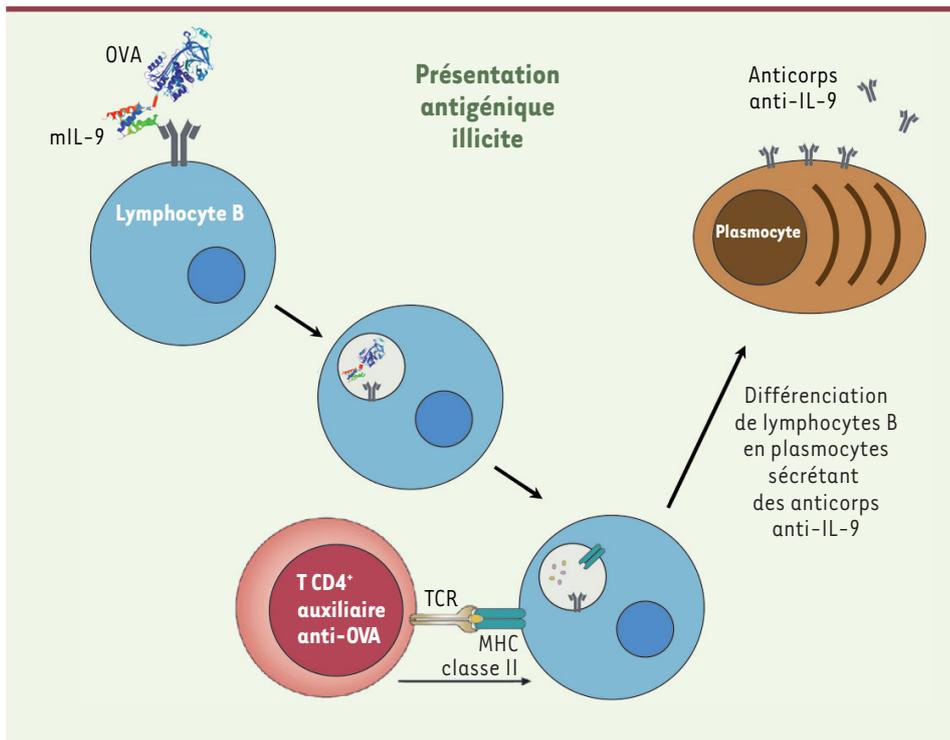


Figure 1. Présentation « illicite » d'un antigène étranger par un lymphocyte B auto-réactif. Exemple de la production d'anticorps anti-IL-9. OVA : ovalbumine ; MHC : major histocompatibility complex ; TCR : T cell receptor.

Différentes protéines étrangères ont été utilisées pour rompre la tolérance contre des cytokines autologues, dont l'hémocyanine de patelle (KLH). Des auto-vaccins utilisant cette dernière, baptisés kinoïdes par analogie aux toxoïdes (toxines bactériennes inactivées), ont été développés contre le TNF- α , l'IFN α , l'IL-4 et le VEGF (vascular endothelial growth factor) par le groupe de D. Zagury (Neovacs SA) [16]. Ces divers

Une autre tentative a été l'utilisation d'une protéine inactivée, une technique bien établie pour diverses toxines, dont celles du choléra et du botulisme. Une tentative d'auto-vaccination thérapeutique basée sur ce principe fut réalisée par D. Zagury [9] pour induire des anticorps anti-IFN α (interféron α) chez des patients infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), en combinant des peptides du VIH avec de l'IFN α inactivé par le formaldéhyde. Seulement 30 % des 112 personnes vaccinées ont développé des anticorps anti-IFN α , mais l'incidence de troubles liés à l'infection était plus faible chez ces patients [10]. Ceci montrait donc qu'une auto-vaccination était envisageable chez l'homme même si la procédure utilisée n'était pas optimale.

Le maillon manquant dans ces expériences était très certainement un élément capable d'activer efficacement les lymphocytes T auxiliaires. En 1996, Mouritsen démontra que la substitution de 11 acides aminés de l'ubiquitine, une protéine très conservée et donc très peu immunogène lors d'hétéro-immunisations, par des séquences de l'ovalbumine (OVA 325-336) ou du lysozyme de poule (Lys 50-61), permettait l'induction d'une réponse immunitaire contre l'ubiquitine non modifiée [11]. En 1999, une modification similaire du TNF- α a permis la production d'auto-anticorps offrant une protection contre l'arthrite expérimentale [12]. À la même époque, nous avons couplé l'IL-9 murine à l'ovalbumine entière en présence de glutaraldéhyde [13] (Figure 1). Cet auto-vaccin provoqua une production importante d'anticorps anti-IL-9 inhibiteurs, qui diminuaient la capacité des souris à expulser le parasite intestinal *Trichuris muris* par le biais d'une perte de contractilité des muscles intestinaux [14] mais, en revanche, amélioraient la résistance de souris BALB/c à *Leishmania major* [15]. Ces résultats démontraient le pouvoir analytique de cette approche expérimentale.

kinoïdes ont des effets fonctionnels très marqués *in vivo*. Par exemple, le kinoïde IFN α diminue les manifestations lupiques des souris NZB/W [17], et celui dirigé contre le VEGF induit des anticorps capables de diminuer la croissance de tumeurs humaines transplantées dans des souris immunodéficientes NOD/SCID (pour une revue plus complète des auto-vaccins à base de kinoïdes, voir [18]).

Nous avons également amélioré nos vaccins en développant une forme polymérique d'ovalbumine couverte de glutaraldéhyde (OVAglu) capable de se coupler aux groupements aminés présents sur les protéines cibles. Grâce à ce polymère OVAglu, nous avons développé des auto-vaccins contre l'IL-17 [19], le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*), l'IL-25, le TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*), l'IL-27 p28 (IL-30), la chimiokine CXCL6/GCP-2 (*granulocyte chemotactic protein-2*) et la métalloprotéase MMP9 [20]. Une autre forme de transporteur très efficace pour obtenir une auto-vaccination est constituée par les VLP (*viral like particles*). Ces nanoparticules icosahédriques d'un diamètre de 25 à 100 nm sont formées par l'assemblage répétitif de protéines identiques. Celle produite par le bactériophage ϕ 3, un Allovirus qui n'infecte qu'*E. coli*, est la seule à avoir été utilisée chez l'homme. Le caractère répétitif des déterminants antigéniques des VLP est responsable de l'activation massive des lymphocytes B lors de certaines infections virales [21]. Les VLP peuvent incorporer des peptides non viraux

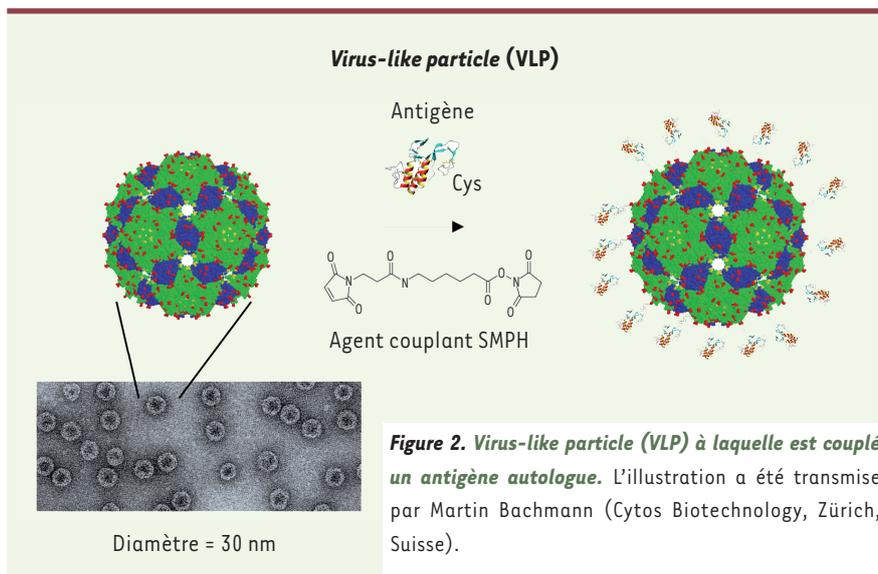


Figure 2. Virus-like particle (VLP) à laquelle est couplé un antigène autologue. L'illustration a été transmise par Martin Bachmann (Cytos Biotechnology, Zürich, Suisse).

CD134L permet une exposition de la protéine cible à la surface des cellules transfectées (Figure 3). L'interaction entre le CD134L et son récepteur sur les T CD4 de souris reste hypothétique. Cette technique a été utilisée en injectant à des souris DBA/2 des cellules tumorales syngéniques P1HTR (variantes du mastocytome P815) transfectées par un plasmide codant pour l'IL-22BP murine-hCD134L [29]. Une variante de cette procédure est l'électrotransfert du plasmide dans les cellules musculaires du tibialis. Cette variante permet d'étendre la vaccination à d'autres souches de souris que la DBA/2.

et induire une réponse immunitaire contre ceux-ci. De plus, elles contiennent des quantités importantes d'ARN d'*E. coli* qui peuvent activer les Toll-like récepteurs (TLR) 7 et 8 et induire une réaction inflammatoire immunostimulante. Toutes ces caractéristiques confèrent aux VLP des propriétés intéressantes dans le développement de vaccins thérapeutiques [22]. Cependant, pour être incorporé dans une VLP, le peptide ne peut pas dépasser une taille de 20 acides aminés. En introduisant une lysine dans le domaine le plus exposé de la protéine HBcAg constituant la VLP, baptisée Qb VLP, il s'est avéré possible de coupler celle-ci à toute protéine présentant une cystéine libre par le biais d'un agent couplant bifonctionnel (Figure 2) [23]. M.F. Bachmann (Cytos Biotechnology AG) a ainsi prouvé le rôle essentiel de l'IL-17 dans la myocardite murine expérimentale [24].

Auto-vaccins nucléiques

Une limitation inhérente à tous les vaccins décrits plus haut est qu'il faut disposer de quantités non négligeables de la protéine cible purifiée. L'injection d'ADN permet de contourner cet obstacle. Ainsi, l'ADN codant pour une IL-5 murine modifiée, injecté dans le muscle de souris C3H, induit des anticorps inhibant l'éosinophilie pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique allergique [25]. Il est probable que les séquences CpG présentes dans l'ADN plasmidique activent le TLR9 (*Toll like receptor 9*) et procurent un effet adjuvant en induisant un environnement inflammatoire.

Une procédure apparentée, développée par J.C. Renauld dans notre laboratoire, utilise l'ADNc de la protéine cible en fusion avec celui du CD134L humain. CD134L (OX-40/CD252) est une protéine transmembranaire de type II, membre de la famille du TNF, normalement exprimée par certaines cellules dendritiques et les lymphocytes B. L'interaction de CD134L avec CD134 (OX-40), membre de la famille des récepteurs du TNF exprimé par les lymphocytes T activés, augmente la production d'immunoglobulines et induit une réponse TH2 (T helper) des T CD4 auxiliaires, ce qui favorise également la réponse anticorps [26-28]. Outre son apport potentiel en déterminants T helper xénogéniques,

Auto-vaccins comme source d'anticorps monoclonaux autologues

L'auto-vaccination permet l'obtention d'anticorps monoclonaux de souris contre des protéines de la même espèce, un avantage considérable pour des études fonctionnelles *in vivo*. À titre d'illustration, l'anticorps MM17F3 anti-IL-17 a été utilisé pour démontrer le rôle essentiel joué par cette cytokine dans l'encéphalite auto-immune expérimentale [30]. Un autre anticorps monoclonal dérivé de souris auto-vaccinées et dirigé contre la chimiokine CXCL6/GCP2 a mis en évidence la contribution essentielle de cette dernière dans la migration des neutrophiles dans des tissus infectés par *Leishmania major* [20]. Cet anticorps a également contribué à la première démonstration de l'effet proangiogénique de cette chimiokine qui favorise la croissance tumorale [31]. Ces exemples illustrent l'importance de ce type de procédures qui permettent aisément de tester la contribution d'une cytokine dans des environnements génétiques distincts, un avantage pratique évident par rapport à l'utilisation de souris *knock-out*.

Conclusion

L'auto-vaccination, qui au départ n'était qu'une « anecdote » immunologique, est devenue en quelques années un outil très performant pour l'analyse fonctionnelle de multiples facteurs biologiques. Elle offre un outil très puissant pour la production d'anticorps monoclonaux autologues chez l'animal et également contre des protéines humaines trop apparentées à leur équivalent murin pour permettre une immunisation efficace.

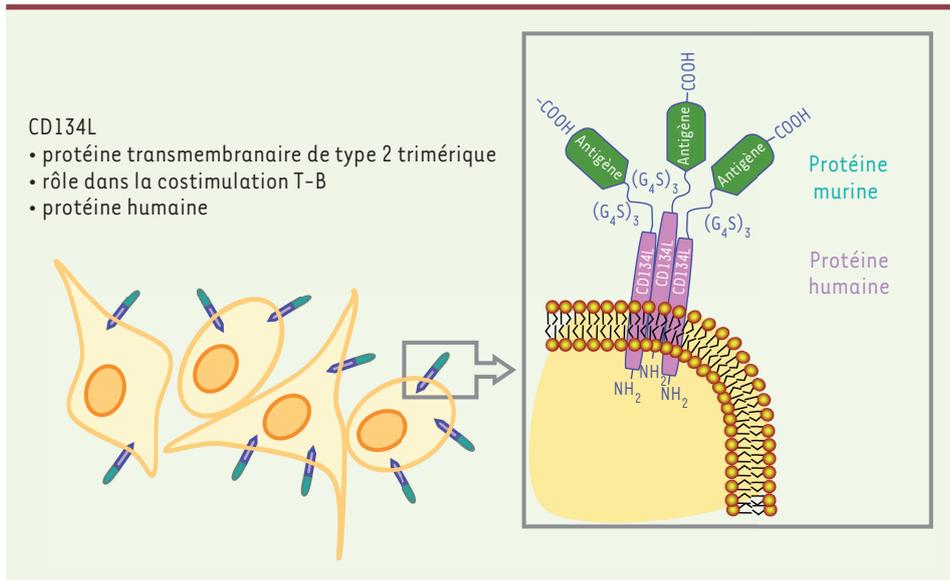


Figure 3. Expression membranaire d'une protéine autologue fusionnée avec CD134L humain.

L'illustration a été transmise par Jean-Christophe Renaud (Institut Ludwig et faculté de médecine, UCL, Bruxelles, Belgique). La séquence reliant le hCD134L et l'antigène murin, (G4S)₃, est constituée de trois motifs répétitifs composés chacun de quatre glycines (G) et d'une sérine (S).

Son application thérapeutique directe chez l'homme reste confrontée au caractère difficilement contrôlable de la réponse dans le temps. Cependant, dans des maladies chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé, dans lesquelles la production excessive d'un facteur bien défini, en l'occurrence le TNF- α ou l'IFN α , joue un rôle critique, l'auto-vaccination pourrait offrir une alternative intéressante à l'administration d'anticorps exogènes. À cet égard, une revue récente publiée par H. Le Buanec *et al.* [32] fait une comparaison détaillée de l'immunothérapie anticytokine passive et active dans des modèles murins et décrit également l'état actuel des applications humaines et des essais cliniques en cours. \diamond

SUMMARY

Auto-vaccines: an immunological alternative to gene silencing

Auto-vaccination is a procedure that recently attracted the interest of a growing number of investigators as an alternative to gene inactivation for functional studies of cytokines or other mediators. It is based on the observation that autologous cytokines cross-linked to a foreign protein or peptide are recognized by self-reactive B cells that present foreign peptides, and by doing so attract illicit help from helper T cells that recognize the foreign peptide on the self-reactive B cell MHC Class II complex. This leads to the production of antibodies reacting with self-proteins and thus to neutralization of the targeted factor. Here, we summarize the different techniques that were successful in breaking this self-tolerance and provide several examples of the functional consequences of these auto-vaccines. An additional output of auto-vaccination is the production of mouse monoclonal antibodies against mouse factors. Such antibodies have obvious advantages for long-term use *in vivo*. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Alten R, Gram H, Joosten LA, *et al.* The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008 ; 10 : R67.
2. Emery P. Optimizing outcomes in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-TNF treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2012 ; 51 : v22-30.
3. Elias JA, Lee CG. IL-13 in asthma. The successful integration of lessons from mice and humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 ; 183 : 957-8.
4. Sebзда E, Mariathasan S, Ohteki T, *et al.* Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999 ; 17 : 829-74.
5. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012 ; 30 : 531-64.
6. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 2264-71.
7. Nemazee DA, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989 ; 337 : 562-6.
8. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 633-43.
9. Zagury D, Bernard J, Halbreich A, *et al.* One-year follow-up of vaccine therapy in HIV-infected immune-deficient individuals: a new strategy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992 ; 5 : 676-81.
10. Gringeri A, Musicco M, Hermans P, *et al.* Active anti-interferon-alpha immunization: a European-Israeli, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in 242 HIV-1-infected patients (the EURIS study). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral* 1999 ; 20 : 358-70.
11. Dalum I, Jensen MR, Hindersson P, *et al.* Breaking of B cell tolerance toward a highly conserved self protein. *J Immunol* 1996 ; 157 : 4796-804.
12. Dalum I, Butler DM, Jensen MR, *et al.* Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat Biotechnol* 1999 ; 17 : 666-9.
13. Richard M, Grecnis RK, Humphreys NE, *et al.* Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 767-72.
14. Khan WI, Richard M, Akiho H, *et al.* Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect Immun* 2003 ; 71 : 2430-8.
15. Arendse B, Van Snick J, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol* 2005 ; 174 : 2205-11.
16. Bizzini B, Drouet B, Zagury D, *et al.* Kinoids: a family of immunogens for active anticytokine immunotherapy applied to autoimmune diseases and cancer. *Immunotherapy* 2010 ; 2 : 347-65.



RÉFÉRENCES

17. Zagury D, Le Buanec H, Mathian A, *et al.* IFNalpha kinoid vaccine-induced neutralizing antibodies prevent clinical manifestations in a lupus flare murine model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 5294-9.
18. Bensussan A, Bizzini B, Pouletty P, *et al.* Les kinoïdes : une nouvelle génération de vaccins thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 306-13.
19. Uyttenhove C, Van Snick J. Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2006 ; 36 : 2868-74.
20. Uyttenhove C, Marillier RG, Tacchini-Cottier F, *et al.* Amine-reactive OVA multimers for auto-vaccination against cytokines and other mediators: perspectives illustrated for GCP-2 in *L. major* infection. *J Leukoc Biol* 2011 ; 89 : 1001-7.
21. Bachmann M, Hoffmann Rorher U, Kündig TM, *et al.* The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993 ; 262 : 1448-51.
22. Bachmann MF, Dyer MR. Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nat Rev Drug Discov* 2004 ; 3 : 81-8.
23. Jegerlehner A, Tissot A, Lechner F, *et al.* A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* 2002 ; 20 : 3104-12.
24. Sonderegger I, Rohn TA, Kurrer MO, *et al.* Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* 2006 ; 36 : 2849-56.
25. Hertz M, Mahalingam S, Dalum I, *et al.* Active vaccination against IL-5 bypasses immunological tolerance and ameliorates experimental asthma. *J Immunol* 2001 ; 167 : 3792-9.
26. Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, *et al.* CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* 2000 ; 164 : 4097-104.
27. Ito T, Wang YH, Duramad O, *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 1213-23.
28. Salek-Ardakani S, Song J, Halteman BS, *et al.* OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 315-24.
29. Lemaire MM, Vanhaunderde A, Nizet Y, *et al.* Induction of autoantibodies against mouse soluble proteins after immunization with living cells presenting the autoantigen at the cell surface in fusion with a human type 2 transmembrane protein. *J Immunol Methods* 2011 ; 367 : 56-62.
30. Uyttenhove C, Sommereyns C, Theate I, *et al.* Anti-IL-17A autovaccination prevents clinical and histological manifestations of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann NY Acad Sci* 2007 ; 1110 : 330-6.
31. Verbeke H, Struyf S, Berghmans N, *et al.* Isotypic neutralizing antibodies against mouse GCP-2/CXCL6 inhibit melanoma growth and metastasis. *Cancer Lett* 2011 ; 302 : 54-62.
32. Le Buanec H, Bensussan A, Bogot M, *et al.* Active and passive anticytokine immune therapies: current status and development. *Adv Immunol* 2012 ; 115 : 187-227.

TIRÉS À PART
C. Uyttenhove

De la jaunisse à l'hépatite C

5 000 ans d'histoire



2^e édition mise à jour
Jean-Louis Payen



ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents.

Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.



BON DE COMMANDE

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris - Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |