

Vaccination antitumorale et thérapie génique

Le but de la vaccination antitumorale est d'induire une réponse immune, spécifique des cellules tumorales, efficace et protectrice. Le développement des techniques de transfert de gènes donne actuellement un nouvel essor à l'immunothérapie active du cancer : l'expression intratumorale du (ou des) gène(s) transféré(s), stimulant localement le système immunitaire, permet de diminuer les effets secondaires liés à une administration par voie générale ; la thérapie génique permet aussi de modifier la composition protéique de la membrane des cellules tumorales. De nombreux essais ont été réalisés dans des modèles tumoraux murins, avec des gènes codant pour des molécules de membrane impliquées dans la présentation de l'antigène ou dans le signal de costimulation ou encore codant pour des cytokines. Le transfert combiné de plusieurs gènes thérapeutiques dans une même cellule permet d'envisager des combinaisons susceptibles d'induire une meilleure stimulation locale du système immunitaire.

Nadine Fernandez
Mohammed-Amine
Abina
Marie-Thérèse Duffour
Hedi Haddada

Les mécanismes d'évolution d'une cellule vers la tumorigénicité commencent à être mieux compris, aussi bien sur le plan moléculaire par l'activation d'oncogènes (exemple : *ras*, *myc*) ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (exemple : *Rb*, *p53*) que sur le plan immunologique (exemple : diminution de l'expression des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité [CMH], sécrétion de facteurs inhibiteurs). Ces connaissances, associées aux progrès réalisés en immunologie fondamentale et en génie génétique, ont permis d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques en cancérologie. Les premiers essais de « l'immunothérapie moderne » par l'équipe de

Rosenberg ont suscité beaucoup d'espairs. Ces travaux reposent principalement sur l'administration systémique de fortes doses d'interleukine 2 (IL2), associées ou non à l'utilisation de lymphocytes du patient stimulés *in vitro* par l'IL2 (LAK : *lymphokine activated killers*) ou de lymphocytes extraits directement de la tumeur (TIL : *tumor infiltrating lymphocytes*) réadministrés au sujet. Les réponses observées en terme de régression tumorale sont souvent partielles, parfois spectaculaires mais les effets secondaires limitent l'administration de doses thérapeutiques nécessaires. Ces travaux ont constitué le point de départ de nombreuses recherches pour développer des thérapies plus efficaces et moins toxiques parmi les-

ADRESSE

N. Fernandez : docteur en pharmacie, étudiante de 3^e cycle. M.A. Abina : docteur en médecine, étudiant de 3^e cycle de sciences. M.T. Duffour : interne en pharmacie, étudiante de 3^e cycle. H. Haddada : docteur ès sciences, chargé de recherche au Cnrs. Laboratoire de génétique des virus oncogènes, Cnrs Ura 1301, Institut Gustave-Roussy, 39, rue Camille-Desmoulin, 94805 Villejuif Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Paul WE. *Fundamental immunology*. New York: William E. Paul MD, 1993: 1490.
2. Pardoll DM. Cancer vaccines. *Immunol Today* 1993; 14: 310-6.
3. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1988; 319: 1676-80.
4. Rosenberg SA. Lymphokine-activate killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 595-603.
5. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-13.
6. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989; 210: 474-85.
7. Lotze MT, Matory YL, Rayner AA. Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer* 1986; 58: 2764-72.
8. Allison MA, Jones SE, McGuffey P. Phase II trial of outpatient interleukin-2 in malignant lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, and selected solid tumors. *J Clin Oncol* 1989; 7: 75-80.
9. Aulitzky W, Gastl G, Aulitzky WE. Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with biologically active dose of recombinant interferon-gamma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1875-84.
10. Kahn A. *Thérapie génique: L'ADN médicament*. Paris: John Libbey Eurotext, 1993: 160.
11. Wallich R, Bulbuc N, Hammerling G, Katzav S, Segal S, Feldman M. Abrogation of metastatic properties of tumor cells by *de novo* expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 1985; 315: 301-5.
12. Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4645-9.
13. Richard Y, Galanaud P. Signaux de la coopération T-B et production d'anticorps. *médecine/sciences* 1995; 11: 691-702.

quelles la thérapie génique est une voie très prometteuse. Cette revue concerne plus particulièrement l'immunothérapie génique des tumeurs solides.

Vaccination

Le terme de vaccination implique l'induction d'une réponse immunitaire chez l'individu ayant reçu le vaccin, il s'agit donc d'une immunité active spécifique d'antigènes. La vaccination comporte deux notions: (1) vaccination curative avec développement – postérieur à la rencontre avec l'(ou les) antigène(s) d'une immunité qui permettra de combattre une maladie en évolution; il s'agit donc ici d'une immunothérapie active; (2) vaccination préventive avec développement d'une immunité protectrice comme les vaccins viraux, avec lesquels les personnes sont immunisées contre des antigènes viraux avant de les avoir rencontrés. Ce type de vaccination est en cours d'étude dans le cadre du cancer. Dans cet article, seule la vaccination à but thérapeutique est développée, c'est la situation dans laquelle le malade est déjà porteur des antigènes tumoraux. Le but est d'induire, par les différents moyens existants, ou en cours de développement, une réponse immunitaire spécifique systémique qui détruira les cellules tumorales quelle que soit leur localisation dans l'organisme.

Cancer et système immunitaire

Il y a cent ans, William Coley, un chirurgien de New York, rapportait des cas de régressions tumorales chez des patients ayant reçu des injections d'extraits bactériens pyogéniques. Il postulait que ces toxines, en stimulant le système immunitaire d'une manière non spécifique, augmentaient la réponse immunitaire antitumorale. De ces observations naquit l'idée de l'immunothérapie du cancer. Depuis, l'histoire de l'immunologie des tumeurs a souvent été comparée à une courbe sinusoïdale oscillant entre l'optimisme et le pessimisme. Les connaissances acquises, relativement récemment, sur les mécanismes immunologiques ont donné un nouvel essor à cette idée. Il a été établi que c'est la réponse des

lymphocytes T (réponse à médiation cellulaire) qui est essentielle et devra donc être la cible principale des stratégies d'immunisation antitumorale. La réponse des lymphocytes T est complexe. En simplifiant, il est possible de la diviser en deux parties (figure 1).

1. La mise en route de la réponse qui fait intervenir des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Il s'agit d'un système à deux signaux, l'un est spécifique de l'antigène et l'autre, dit de costimulation, ne dépend pas de l'antigène. Le premier signal implique les molécules de classe II du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) qui, associées à un peptide de l'antigène intégré par endocytose et dégradé, constituent le ligand du récepteur des lymphocytes T (TcR, *T cell receptor*). Le deuxième signal fait intervenir, entre autres, la molécule B7, ligand du récepteur CD28 situé lui aussi sur les lymphocytes T. Cette double interaction entraîne la sécrétion de nombreuses cytokines par les deux partenaires cellulaires, dont l'interleukine 2 (IL2), qui, sécrétées par les lymphocytes T CD4⁺, vont permettre la prolifération du clone T ayant reconnu l'antigène et donc l'amplification de la réponse. Il est important de souligner que l'occupation du TcR en l'absence du signal de costimulation entraîne l'anergie des cellules T, mécanisme potentiellement responsable de l'induction d'une tolérance.

2. La réponse effectrice cytotoxique spécifique de l'antigène est dite restreinte par le CMH car elle est relayée par les lymphocytes T CD8⁺ qui nécessitent, eux aussi, deux signaux: le premier est la reconnaissance par leur TcR de l'antigène associé à une molécule de classe I du CMH; le deuxième signal est plus complexe; il est assuré par différentes cytokines, dont l'IL2, qui permettent la différenciation et la prolifération des CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces 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

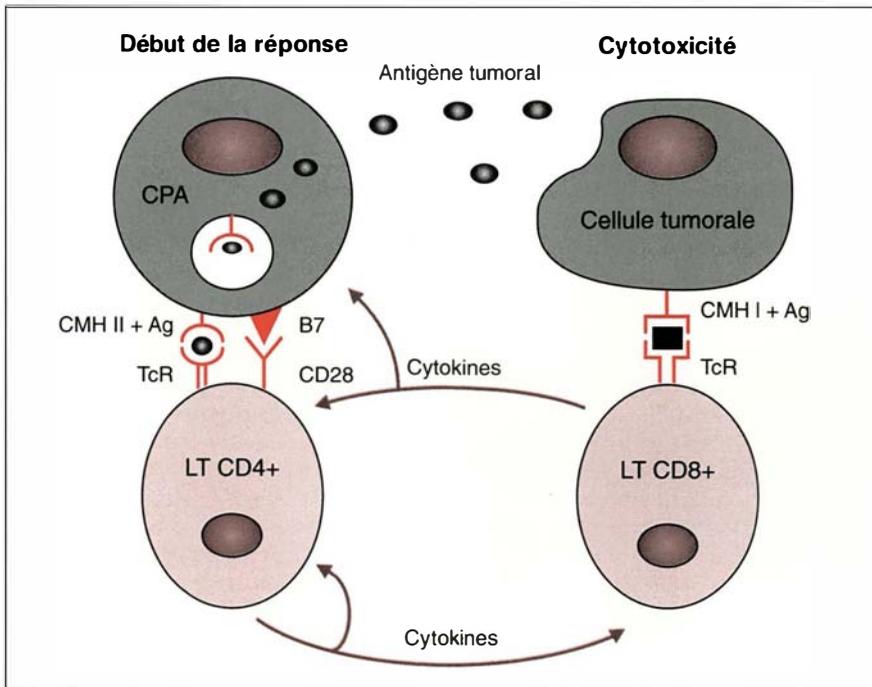


Figure 1. Développement d'une réponse immune antitumorale. Des antigènes tumoraux libérés par la cellule tumorale sont internalisés par endocytose par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) comme des macrophages ou des cellules dendritiques. L'antigène est apprêté par ces cellules, les peptides antigéniques obtenus sont présentés aux lymphocytes T (LT) CD4⁺ associés à des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le signal antigénique est délivré aux LT lors de la reconnaissance de ce complexe par leur récepteur de l'antigène (TcR). Les LT ne seront activés que si ce premier signal est doublé d'un second, le signal de costimulation. Ce signal est délivré lors de l'interaction de récepteurs accessoires avec des ligands situés à la surface des CPA. Parmi les molécules avec des fonctions de costimulation, B7 est importante car sa liaison à son récepteur, CD28, engendre un signal clé pour le développement d'une réponse immune à médiation cellulaire. Les LT CD4⁺ activés vont proliférer et sécréter des cytokines. Certains de ces médiateurs solubles vont permettre aux LT CD8⁺ qui ont reçu un signal antigénique de proliférer et de se différencier en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Le signal antigénique provient de la reconnaissance par leur TcR d'un complexe peptide antigénique-molécule de classe I du CMH à la surface de la cellule tumorale. Les CTL sont responsables de la fonction effectrice cytotoxique de la réponse immune antitumorale. Les LT CD8⁺ activés vont aussi sécréter des cytokines qui vont permettre, par leur action sur différents types cellulaires, une amplification de la réponse immune induite.

immune spécifique de l'antigène, systémique, 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 sa tumeur.

L'absence d'une réponse immune efficace spontanée contre des cel-

lules cancéreuses possédant des antigènes tumoraux peut avoir différentes origines comme l'absence de peptides antigéniques présentables par les molécules de classe II du CMH, une présentation insuffisante des antigènes par les CPA (cellules présentatrices de l'antigène), une insuffisance quantitative de cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD4⁺. 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. Tout cela peut entraîner une anergie des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux ou une tolérance par ignorance [1].

Dans certains cas, des lymphocytes T spécifiques de la tumeur ont pu être mis en évidence chez des malades, indiquant qu'il y a bien eu amorce et développement d'une réponse immune spécifique mais, apparemment, et pour des raisons encore mal comprises, absence ou insuffisance d'amplification de cette réponse. Cette liste des mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire n'est évidemment pas exhaustive.

Les premières tentatives de vaccination antitumorale sont anciennes avec l'injection, dans le cas des tumeurs solides, de cellules tumorales allogéniques ou autologues irradiées, de lysats de cellules cancéreuses ou parfois de cellules tumorales infectées par un virus et irradiées. Dans la plupart des cas, ce « vaccin » était coadministré avec des adjuvants comme le BCG (bacille de Calmette-Guérin). Les résultats difficilement interprétables par absence de paramètres comparables entre les différentes études, par la nature indéterminée des adjuvants utilisés, n'ont pas permis de déterminer quel protocole induisait une réponse immune maximale. Des stabilisations, des rémissions partielles, voire des rémissions complètes, ont été rapportées de manière inconstante pour des cancers rénaux et des mélanomes, cancers connus pour des cas occasionnels de rémissions spontanées [2]. Cependant, l'absence de résultats suffisamment encourageants avait entraîné un abandon relatif de l'idée de l'immunothérapie du cancer. Les progrès considérables réalisés en oncologie, en immunologie et en biologie moléculaire ont permis de mieux définir les fonctions de différentes molécules comme les cytokines ou les molécules de surface de cellules du système immunitaire et leur utilisation a pu être envisagée en thérapie.

RÉFÉRENCES

14. Hérold C, Elhabazi A, Bensussan A, Boumsell L. Implication des molécules « CD » dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T. *médecine/sciences* 1995; 11: 669-80.
15. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Danle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; 173: 721-30.
16. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulat DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-9.
17. Chen L, Linsley PS, Hellström KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 1993; 14: 483-6.
18. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259: 368-70.
19. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992; 71: 1065-8.
20. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellström I, Hellström KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; 179: 523-32.
21. Chen L, Ashe S, Brady WA, I. H, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992; 71: 1093-102.
22. Baskar S, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N, Nadler LM, Freeman GJ, Glimcher LH. Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5687-90.
23. Colombo MP, Modesti A, Parmiani G, Forni G. Local cytokine availability elicits tumor rejection and systemic immunity through granulocyte-T-lymphocyte cross-talk. *Cancer Res* 1992; 52: 4853-7.
24. Tahara H, Zeh III HJ, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma *in vivo*. *Cancer Res* 1994; 54: 182-9.

Les premiers essais de traitement du cancer découlant de ces progrès ont été des protocoles d'immunothérapie adoptive. Ils consistent schématiquement à prélever chez le malade des lymphocytes périphériques ou infiltrant les tumeurs (TIL) [3], à les cultiver *ex vivo* en présence d'IL2 [4] afin de les activer et de les amplifier, puis à les réinjecter au malade en association à des doses importantes d'IL2 [5]. Ces essais, malgré des résultats spectaculaires mais rares, se sont révélés décevants dans l'ensemble, en partie à cause de la toxicité élevée des cytokines [6, 7]. D'autres essais utilisent des injections directes de cytokines recombinantes comme l'IL2 ou les interférons (IFN) avec des résultats variables suivant les types de cancer traités [8, 9]. Actuellement, de nombreux protocoles cliniques associant chimiothérapie et administration de cytokines, surtout IL2 et/ou IFN α , sont en cours.

Thérapie génique et vaccination antitumorale

Le clonage de nombreux gènes et le développement des techniques de transfert dans les cellules de mammifères ont donné naissance à une nouvelle approche thérapeutique: la thérapie génique (pour revue, voir [10]). Différents moyens permettent de déclencher une réponse immunitaire systémique par thérapie génique: on peut augmenter l'immunogénicité des tumeurs en modifiant génétiquement les cellules tumorales, agir directement sur les cellules impliquées dans la réponse immunitaire spécifique (par exemple: transfert de gènes dans les TIL) ou intervenir dans l'immunité non spécifique *via* des cellules comme les cellules NK (*natural killer*) ou les macrophages. Deux stratégies de vaccination peuvent être schématiquement distinguées, la première utilise les cellules tumorales du patient comme source d'antigènes alors que la seconde utilise des antigènes, purifiés ou synthétisés, identifiés dans la tumeur. Dans le cadre de la première stratégie, l'immunité active peut être obtenue, soit en augmentant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, soit en augmentant la costimulation.

Les cellules tumorales comme source d'antigènes

• Augmenter la présentation de l'antigène

L'introduction des gènes du CMH dans les tumeurs est parmi les premières approches utilisées. L'augmentation des molécules de classe I à la surface des cellules tumorales diminue la tumorigénicité dans les modèles murins, vraisemblablement par augmentation de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8⁺ [11]. Des rejets de tumeurs ont été obtenus également par transfection de molécules de classe I allogéniques qui pourraient agir par l'intermédiaire d'une réaction de type rejet de greffon incompatible, avec réaction inflammatoire et production de cytokines intervenant dans l'élimination des cellules tumorales non transfectées [12]. L'introduction de gènes de molécules de classe II du CMH a, dans certains modèles de tumeurs murines, entraîné le développement d'une immunité systémique contre les cellules non modifiées. L'une des hypothèses pour expliquer ce mode d'action serait une présentation directe de l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ par les cellules tumorales. Le transfert du gène de l'interféron α ou γ dans les cellules tumorales peut également augmenter la présentation en stimulant l'expression des gènes codant pour les molécules de classe I et/ou II.

• Augmenter la costimulation

Parmi les molécules de membrane connues pour leur action de costimulation, la famille des molécules B7 est très importante [13, 14]. Ces protéines sont essentiellement exprimées à la surface des CPA et possèdent deux récepteurs, CD28 et CTLA-4, situés à la surface des lymphocytes T. CTLA-4 est mal connu mais CD28 a été bien étudié et l'on sait que sa stimulation provoque une augmentation importante de la production de cytokines, surtout d'IL2, à la suite de la reconnaissance de l'antigène par les cellules T [15]. Par ailleurs, le blocage de l'interaction B7-CD28, après stimulation antigénique, entraîne une anergie fonctionnelle des lymphocytes T [16]. Le rôle critique de ce couple dans l'activation des lymphocytes T a fait de B7

un gène candidat au transfert dans les cellules tumorales pour accroître leur immunogénicité. De fait, des études ont montré que l'injection dans des modèles murins de cellules tumorales exprimant B7 induisait le développement d'une immunité systémique contre les cellules parentales [17, 18]. Le mécanisme d'action proposé est une stimulation directe, par les cellules tumorales, des lymphocytes T CD8⁺ qui ainsi sécrètent les cytokines en quantité suffisante pour que l'aide des lymphocytes T CD4⁺ soit inutile [19]. Néanmoins, certaines expériences ont montré que le transfert du gène codant pour la molécule B7, dans des tumeurs peu immunogènes, n'est pas toujours suffisant pour induire une réponse immune antitumorale protectrice avec augmentation de l'activité cytotoxique spécifique [20]. Certains modèles de tumeurs ont nécessité l'introduction du gène B7 et la présence, soit d'un antigène tumoral fort [21], soit d'un gène codant pour une molécule de classe II du CMH [22]. Cela montre bien qu'il est nécessaire d'adapter le « traitement » à la tumeur.

L'autre moyen d'augmenter la costimulation, dans un sens plus général, est l'utilisation de cellules tumorales transfectées par des gènes de cytokines. Ces molécules sont nombreuses et les expériences les concernant ne le sont pas moins. Le but de celles-ci est de changer l'environnement immunologique de la tumeur de façon à augmenter, de manière indirecte, la présentation des antigènes spécifiques de la tumeur et/ou l'activation des lymphocytes spécifiques de ces antigènes. Le transfert de gènes de cytokines permet d'obtenir une sécrétion locale avec une diffusion systémique très faible et, donc, une toxicité nettement diminuée par rapport à une administration par voie générale [2]. Si la cellule génétiquement modifiée est la cellule tumorale elle-même, sa destruction par le système immunitaire entraînera la libération des antigènes tumoraux qui seront internalisés par endocytose par les cellules spécialisées (CPA) qui amplifieront la réponse immune. Dans les modèles murins, la présence de différentes interleukines – IL1, IL2, IL4, IL6, IL7, IL10, IL12, IFN γ , TNF α (*tumor necrosis factor α*), G-CSF

(*granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant-protein 1*) – dans la tumeur entraîne une inhibition de la croissance tumorale. Dans ces systèmes, les cytokines n'empêchent pas la prolifération tumorale mais sont capables d'activer rapidement une réaction antitumorale efficace qui empêche la progression de cette tumeur [23, 24]. A la suite du transfert des gènes codant pour l'IL2, IL4, IL6, IL7, IL12, IFN γ , TNF α et GM-CSF, la réponse immune antitumorale s'est révélée protectrice vis-à-vis d'une injection ultérieure de cellules parentales non modifiées [25]. D'autres études ont montré, en outre, qu'une tumeur préexistante pouvait régresser, voire disparaître, sous l'action de la réponse immune systémique engendrée par l'injection intratumorale de cellules cancéreuses génétiquement modifiées par les gènes codant pour l'IL2, l'IL4, l'IL6, ou le GM-CSF. Des effets synergiques de différentes combinaisons ont aussi été observés [25].

Selon les cytokines étudiées, les cellules recrutées à la phase d'induction de la réponse antitumorale sont différentes; ainsi, l'IL1, IL2, IL7, IFN γ , GM-CSF, IL1 plus IL2, IL1 plus IL4, nécessitent la présence de lymphocytes T alors que le G-CSF ou le MCP-1 sont apparemment capables d'entraîner une réponse en l'absence de lymphocytes T [23, 26]. Pour l'IL4, l'IL6 et le TNF α , la nécessité de la présence ou non de cellules T pour induire la réponse antitumorale semble dépendre des conditions expérimentales. Quoiqu'une inhibition tumorale efficace mais transitoire ait été parfois observée en l'absence totale de lymphocytes T CD8⁺, la plupart des cytokines codées par les gènes transférés dans les cellules tumorales (dont l'IL2, l'IL4, l'IL7, l'IFN γ et le TNF α) nécessitent la présence des lymphocytes CD8⁺ pour la phase effectrice à long terme (*m/s n° 1, vol. 8, p. 80*), et parfois aussi des lymphocytes T CD4⁺ (comme dans le cas de l'utilisation des gènes de l'IL7 et du GM-CSF) [27]. La régression tumorale est bien liée à une lyse cellulaire directe et non à une altération des vaisseaux sanguins avec nécrose hémorragique entraînant secondairement une dégénérescence tumorale,

comme cela est observé lors de l'administration systémique de TNF α ou d'IL1. La réponse initiale, liée à l'action même de la (ou des) cytokine(s) utilisée(s), peut être de type inflammatoire (comme pour l'IL4, l'IL7 ou le G-CSF), et donc non spécifique, ou de type immun (comme pour l'IFN γ ou le GM-CSF), et donc spécifique [28]. Le plus souvent, les tumeurs contenant des cellules tumorales modifiées sont massivement infiltrées par des granulocytes, des lymphocytes et des macrophages [23]. En fait, l'inhibition tumorale semble être le résultat, quelle que soit la cytokine en cause, d'un intense échange, par communication *via* les molécules de surface et les médiateurs solubles, entre les différents types cellulaires engagés dans la réponse antitumorale. Selon la cytokine utilisée, le recrutement cellulaire se fait sans doute dans un ordre variable entraînant une réponse primaire différente, mais la résultante semble être, dans la plupart des cas, une réponse immune systémique spécifique avec apparition de cellules mémoire puisque des cellules non modifiées injectées ultérieurement sont rejetées.

Il semble difficile à l'heure actuelle de comparer l'efficacité respective des différentes cytokines du fait de la très grande diversité des protocoles et des modèles utilisés. La première étude dans laquelle on a comparé directement l'efficacité de différents gènes de cytokines, dans des modèles tumoraux murins, utilisait des cellules infectées par un rétrovirus recombinant [29]. Elle montra que, pour certaines tumeurs faiblement ou modérément immunogéniques, l'immunisation par des cellules irradiées exprimant le GM-CSF murin induisait l'immunité antitumorale spécifique à long terme la plus efficace. Quoique ces tumeurs fussent négatives pour l'expression des molécules de classe II du CMH, la présence à la fois des lymphocytes T CD4⁺ et des CD8⁺ était nécessaire au développement de la réponse immune. L'efficacité du GM-CSF sécrété localement serait liée à sa capacité d'induire la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en cellules dendritiques qui sont les cellules présentatrices d'antigène les plus efficaces pour les lymphocytes T CD4⁺.

RÉFÉRENCES

25. Bruyns C, Gérard C, Velu T. Cytokine gene transfer for the treatment of cancer. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994; 36: S17-20.
26. Colombo MP, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today* 1994; 15: 48-51.
27. Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, Qin Z, Diamantstein T, Blankenstein T. Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2774-8.
28. Tepper RI, Mulé JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 153-64.
29. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3539-43.
30. Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 1994; 10: 174-8.
31. van Der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van Den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
32. Traversari C, van Der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 1992; 176: 1453-7.
33. Pardoll DM. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 719-25.
34. Srivastava PK. Protein tumor antigens. *Curr Op Immunol* 1991; 3: 654-8.
35. Klein G, Boon T. Tumor immunology: present perspectives. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 687-92.

Le *Tableau 1* présente des exemples d'études menées dans différents modèles murins avec des cellules tumorales génétiquement modifiées par des gènes de cytokines.

Des essais cliniques de thérapie génique du cancer, dont certains avec des gènes de cytokines, d'antigènes du CMH ou de la molécule B7, ont été approuvés par le *US Recombinant DNA Advisory Committee* et certains de ces essais sont en cours [28, 30].

Antigènes tumoraux

Des progrès récents dans l'identification d'antigènes associés aux tumeurs, comme MAGE-1 (*melanoma associated antigen*) caractérisé par l'équipe de Boon [31] et des peptides antigéniques présentés [32] ont stimulé la poursuite de la recherche dans ce domaine. L'implication des lymphocytes T dans la réponse antitumorale a mis en évidence l'importance, non seulement de l'antigène, mais surtout de la présentation par les molécules du CMH d'un peptide antigénique provenant de la dégradation contrôlée de l'antigène qui peut être d'origine intracellulaire (présentation par les molécules de classe I) ou extracellulaire (présentation par les molécules de classe II). Des haplotypes de CMH différents vont présenter des peptides différents, non seulement dans leur séquence primaire, mais aussi dans leur conformation tridimensionnelle. Ainsi, les épitopes spécifiques reconnus par le système immunitaire varient d'un individu à un autre en fonction de leur haplotype HLA. Si la cellule cancéreuse est capable de présenter elle-même ces antigènes, alors l'identification des peptides présentés par les molécules de classe I du patient pourrait ne pas être nécessaire. Il devrait être possible de combiner l'apport du gène codant pour l'antigène avec un (ou des) gène(s) pouvant augmenter sa présentation. On pourrait également cibler l'antigène vers le compartiment endosomique/lysosomal en lui associant une séquence signal comme celle portée par les protéines membranaires associées aux lysosomes (LAMP, pour *lysosome associated membrane protein*), ce qui permettrait d'augmenter sa présentation par les molécules de classe II du CMH

aux lymphocytes T CD4⁺ [33]. Si la cellule cancéreuse dégrade l'antigène en quantité insuffisante, il faut alors tenter d'augmenter la réponse immune de façon indirecte ou d'introduire, dans la cellule, les peptides antigéniques à présenter, ce qui implique une étude cas par cas des tumeurs à traiter [34, 35].

Une autre approche potentiellement très intéressante serait le transfert du gène codant pour l'antigène spécifique de tumeurs dans des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène comme les macrophages ou les cellules dendritiques [36].

Les vecteurs de la thérapie génique

La thérapie génique du cancer repose sur l'introduction d'un (ou de plusieurs) gène(s) thérapeutique(s) dans une population cellulaire cible qui peut être composée de cellules tumorales elles-mêmes, de cellules autologues dotées d'une activité antitumorale potentielle comme les TIL ou les macrophages [37] ou de cellules allogéniques [38].

Les méthodes de transfert de gènes dans les cellules de mammifères peuvent être divisées en deux groupes selon qu'elles font appel à des vecteurs non viraux ou à des vecteurs viraux.

1. Les vecteurs non viraux reposent pour la plupart sur la capacité de la cellule d'internaliser par endocytose les macromolécules. Actuellement, la majorité des études sont centrées sur des méthodes reposant sur les voies d'endocytose relayées par des récepteurs car de telles méthodes permettraient de cibler *in vivo* le type cellulaire à transfecter. Ces techniques impliquent la production de complexes entre un plasmide contenant le gène choisi et des ligands polypeptidiques spécifiques qui peuvent être reconnus par des récepteurs à la surface de la cellule. Un des problèmes de ce type de transfert est que les vésicules d'endocytose sont normalement transportées jusqu'aux lysosomes où leur contenu est dégradé. Donc l'efficacité du transfert dépend de l'échappement de l'ADN de l'endosome avant sa dégradation. Des équipes ont utilisé des adénovirus inactivés ou des peptides fusiogènes de l'hémaggluti-

Tableau I

CELLULES TUMORALES MODIFIÉES PAR DES GÈNES DE CYTOKINES: EFFETS *IN VIVO* DANS DES MODÈLES TUMORAUX MURINS

Cytokines	Modèle tumoral	Cellules effectrices majeures	Autres cellules effectrices possibles	Commentaire
IL1	NIH-3T3 transformées	ND	ND	Régression de tumeurs chez des souris syngéniques
IL2	Carcinome du côlon, CT-26 Mélanome, B16 Fibrosarcome, CMS-5, MCA-102 Mastocytome, P815 Adénocarcinome mammaire, TS/A Carcinome de la vessie, MBT-2 Carcinome pulmonaire, 3LL	LT CD8 ⁺	NK, N Eos, M	L'expression de taux élevés d'IL2 entraîne une régression de la tumeur modifiée Dans quelques modèles tumoraux, une réponse immune systémique est produite par des injections ultérieures de cellules parentales non modifiées Il existe une corrélation entre des taux croissants de production locale d'IL2 et les réponses antitumorales locales et systémiques
IL4	Plasmocytome, J558L Adénocarcinome mammaire, K485 Carcinome rénal, RENCA	Eos	LT CD8 ⁺ LT CD4 ⁺ M	L'expression de taux élevés d'IL4 entraîne une régression de la tumeur modifiée Dans quelques modèles tumoraux, la réponse immune systémique qui est engendrée par des injections ultérieures de cellules parentales non modifiées est supérieure à celle induite par des cellules tumorales irradiées non modifiées
IL6	Carcinome pulmonaire, 3LL Mélanome, B16 Sarcome, MCA-207	LT CD4 ⁺ LT CD8 ⁺	NK, M	Régression de tumeurs chez des souris syngéniques
IL7	Plasmocytome, J558L Adénocarcinome mammaire, TS/A Fibrosarcome, FSA	LT CD4 ⁺ LT CD8 ⁺ M	Eos	Régression de tumeurs chez des souris syngéniques
IFN γ	Neuroblastome, C1300 Fibrosarcome, CMS-5 Adénocarcinome, SP1 Carcinome du côlon, CT-26 Carcinome pulmonaire, 3LL Carcinome de la vessie, MBT-2 Adénocarcinome mammaire, TS/A	LT CD8 ⁺	NK	L'introduction du gène de l'interféron γ dans les cellules tumorales généralement induit ou augmente l'expression à la fois des molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité Dans quelques modèles tumoraux, l'expression de l'IFN γ entraîne un rejet de la tumeur modifiée et le développement d'une immunité systémique
TNF α	Tumeur cutanée, 1591-RE Plasmocytome, J558L Sarcome, MCA-205, MCA-102	LT CD4 ⁺ LT CD8 ⁺	M	Les cellules tumorales modifiées par le gène du TNF α poussent typiquement moins vite <i>in vitro</i> et sont rejetées lors de leur injection à des animaux syngéniques L'immunisation par des cellules tumorales portant le gène du TNF α n'engendre pas, en général, une immunité systémique supérieure à celle induite par l'injection de cellules irradiées non modifiées
GM-CSF	Mélanome, B16 Carcinome du côlon, CT-26 Fibrosarcome, CMS-5, WP-4 Carcinome rénal, RENCA	LT CD4 ⁺ LT CD8 ⁺	M Cellules dendritiques	L'injection de cellules modifiées par le gène du GM-CSF induit une immunité antitumorale systémique à long terme
G-CSF	Adénocarcinome du côlon, C-26	N		L'infiltrat inflammatoire local est caractérisé par un grand nombre de macrophages Pas d'augmentation documentée de l'immunité systémique
MCP-1	Mélanome, B16	N		L'infiltrat inflammatoire local est caractérisé par un grand nombre de macrophages Pas d'augmentation documentée de l'immunité systémique

IL: interleukine ; IFN: interféron ; TNF: tumor necrosis factor ; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor ; MCP1: monocyte chemoattractant protein ; LT: lymphocytes T ; Eos: éosinophiles ; M: macrophages ; N: polynucléaires neutrophiles, NK: cellules natural killers ; ND: non déterminé. (D'après [2, 26, 28].)

RÉFÉRENCES

36. Boon T. Towards a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Adv Cancer Res* 1992; 58: 177.
37. Haddada H, Lopez M, Martinache C, Ragot T, Abina MA, Perricaudet M. Efficient adenovirus-mediated gene transfer into human blood monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 1174-83.
38. Roth C. Activer l'immunité pour combattre le cancer. *La Recherche* 1993; 24: 905-7.
39. Monsigny M, Midoux P, Roche AC. Perspectives *ex vivo* et *in vivo* pour la thérapie génique de la transfection sélective à l'aide de complexes plasmide-polylysine ciblées. *médecine/sciences* 1993; 9: 441-9.
40. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-32.
41. Vile R, Russell SJ. Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1994; 1: 88-98.
42. Cohen-Haguénauer O. A review of current basic approaches to gene therapy. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994; 36: S3-9.
43. Lehn P. Vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes dans le tissu hématopoïétique *in vivo*. *médecine/sciences* 1990; 6: 791-9.
44. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 51-64.
45. Chasse JF, Levrero M, Kamoun P, Minet M, Briand P, Perricaudet M. L'adénovirus: vecteur de thérapie génique? *médecine/sciences* 1989; 5: 331-7.
46. Gerard RD, Meidell RS. Adenovirus-mediated gene transfer. *TCM* 1993; 3: 171-7.
47. Stratford-Perricaudet L, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 241-56.
48. Epstein A. Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes. *médecine/sciences* 1992; 8: 902-11.

nine A du virus influenza associés au complexe ADN-ligand pour induire la rupture de l'endosome contenant l'ADN. Dans les deux cas, les résultats ont montré une augmentation très nette du transfert ciblé du gène et de son expression [39, 40]. Les résultats obtenus *in vivo* indiquent que l'expression des gènes est transitoire et ces méthodes présentent, en général, une efficacité de transfert faible [41, 42].

2. Les vecteurs viraux ont connu un développement important ces dernières années. Le principe de production de virus recombinants défectueux pour la réplication repose sur l'utilisation d'un génome viral ayant des délétions plus ou moins importantes et de lignées cellulaires qui apportent les protéines nécessaires à la production de virions. La place laissée par cette délétion est utilisée pour insérer le gène à transférer. Cette construction est introduite dans les cellules de la lignée adéquate, ce qui permet d'obtenir un grand nombre de particules virales recombinantes.

Les rétrovirus sont actuellement les plus utilisés en thérapie génique (*m/s n° 11, vol. 7, p. 1088*) [43], ils ont déjà été de nombreuses fois testés dans des protocoles cliniques. L'intérêt de ces vecteurs réside dans leur importante efficacité de transfert *ex vivo*. L'insertion du génome viral dans celui de la cellule hôte assure une expression stable au fil des divisions cellulaires [44]. Le niveau d'expression du transgène est, en général, modéré. Ces vecteurs sont capables d'infecter uniquement des cellules en division, ce qui limite leurs cibles potentielles *in vivo*. Les particules rétrovirales sont relativement labiles par rapport à d'autres virus et elles sont rapidement inactivées *in vivo* par un processus apparemment dépendant du complément; enfin, les rétrovirus sont peu immunogènes. Des progrès importants ont été réalisés dans le développement de lignées d'emballage qui permettent d'obtenir des titres élevés de virus recombinants défectueux pour la réplication sans production de virus de type sauvage. L'introduction directe de ces lignées irradiées dans le tissu cible a permis d'améliorer nettement l'efficacité de transfert *in vivo* [40].

L'utilisation des adénovirus est beaucoup plus récente [45]. Ces vecteurs sont capables d'infecter de nom-

breux types cellulaires en division ou non avec une efficacité importante et le niveau d'expression du transgène est élevé (*m/s n° 2, vol. 9, p. 236, p. 238*) [46]. Les particules virales sont relativement stables – ce qui permet de purifier et de concentrer les virus recombinants – elles ne sont pas inactivées *in vivo* et sont immunogènes [25]. Apparemment, lors d'infection massive de cellules non permissives, le génome viral ne s'intègre pas dans celui de la cellule hôte. Cela implique une expression transitoire du transgène par effet de dilution au cours des divisions cellulaires successives. Cependant, des expressions à long terme ont été rapportées [47]; elles ont été expliquées, dans certains cas, par un taux de renouvellement cellulaire très faible et, dans d'autres cas, par la présence d'une réplication virale à un niveau faible mais suffisant pour assurer la persistance de l'expression du transgène [40]. La présence de virus partiellement compétents pour la réplication dépendrait essentiellement de la cellule cible (production de facteurs spécifiques, stade du cycle cellulaire). Un essai clinique utilisant un adénovirus recombinant pour le gène de la β -galactosidase, enzyme qui permet de marquer les cellules qui l'expriment, a été accepté pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de ce vecteur (Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France).

Les autres systèmes viraux tels ceux dérivés du virus de la vaccine, de l'*Herpes virus* [48], des virus associés à l'adénovirus (AAV) et de quelques virus à ARN sont moins bien développés [44].

Conclusion

Un des problèmes majeurs de la thérapie génique directe *in vivo* reste le ciblage des cellules à transférer mais, dans le cas des tumeurs solides, l'injection intratumorale permet un ciblage physique du vecteur. Suivant la stratégie thérapeutique envisagée, le transfert peut avoir lieu *ex vivo* ou *in vivo*. Les conditions précises à remplir par le système de transfert sont fonction de la stratégie utilisée mais dans tous les cas, la méthode de transfert sera choisie sur des critères d'efficacité, de sécurité, de niveau d'expression du gène et de maniabi-

lité. Le développement de vecteurs mieux adaptés reste une priorité pour les années à venir.

L'étude des modèles animaux a fortement contribué au développement des connaissances actuelles mais ces modèles ne miment que partiellement la situation chez l'homme. Des modèles plus proches des situations pathologiques humaines sont en cours de développement, comme des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) porteuses de tumeurs humaines et reconstituées avec des cellules immunocompétentes autologues.

Le nombre de gènes thérapeutiques potentiellement utilisables en immunothérapie du cancer par génie génétique est important. Actuellement, ces gènes sont le plus souvent testés seuls, mais il apparaît que leurs combinaisons pourraient présenter une efficacité supérieure. Selon les modèles choisis et les modalités d'administration, les résultats enregistrés sont variables. Il semble évident que le traitement des cancers par immunothérapie génique devra, dans tous les cas, être adapté à chaque situation clinique. Différents protocoles pourront être imaginés avec transfert de gènes *in vivo* ou *ex vivo* associés ou non à des traitements conventionnels ou en traitement de relais ■

TIRÉS À PART

H. Haddada.

Summary

Antitumoral vaccination and gene therapy

The goal of antitumoral vaccination is to induce an efficient, protective and specific immune response against tumor cells. Immunotherapy against cancer is an old idea that is currently undergoing a renaissance following the refinements of techniques of gene transfer. Intratumoral expression of transferred genes allows a local stimulation of the immune system around the tumor and reduces secondary effects linked to systemic administration. Gene therapy also allows the modification of the protein composition of the tumor cell membrane. The possibility of intervening at both levels of soluble mediators and membrane proteins is a strong argument for cancer immunotherapy. Many assays have been conducted on murine tumor models with genes coding for membrane molecules implicated in antigen presentation, in the costimulation signal, or for cytokines. The possibility of transferring various genes in the same cell could permit the transfer of combinations of therapeutic genes to obtain an optimum local stimulation of the immune system against the tumor.