

Les membres du Conseil Scientifique de la SFTCG ont sélectionné pour vous quelques publications parues durant les trois derniers mois. Bien entendu, il ne s'agit pas d'une liste exhaustive mais juste d'une sélection qui reflète les intérêts des personnes qui ont rédigé cette Newsletter.

### Thérapie cellulaire

*Sci Transl Med* 18 May 2011: Vol. 3, Issue 83, p. 83ra40

#### **Functional Regulatory T Cells Produced by Inhibiting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Type 3 Prevent Allograft Rejection**

Gang Feng, Satish N. Nadig, Liselotte Bäckdahl, Stephan Beck, Ross S. Francis, Alexandru Schiopu, Andrew Whatcott, Kathryn J. Wood and Andrew Bushell.

<http://stm.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/3/83/83ra40.abstract>

*Sci Transl Med* 18 May 2011: Vol. 3, Issue 83, p. 83ra41

#### **Massive ex Vivo Expansion of Human Natural Regulatory T Cells (T<sub>regs</sub>) with Minimal Loss of in Vivo Functional Activity**

Keli L. Hippen, Sarah C. Merkel, Dawn K. Schirm, Christine M. Sieben, Darin Sumstad, Diane M. Kadidlo, David H. McKenna, Jonathan S. Bromberg, Bruce L. Levine, James L. Riley, Carl H. June, Phillip Scheinberg, Daniel C. Douek, Jeffrey S. Miller, John E. Wagner and Bruce R. Blazar

<http://stm.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/3/83/83ra41.abstract>

*Sci Transl Med* 18 May 2011: Vol. 3, Issue 83, p. 83ra42

#### **Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells**

Pervinder Sagoo, Niwa Ali, Garima Garg, Frank O. Nestle, Robert I. Lechler and Giovanna Lombardi

<http://stm.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/3/83/83ra42.abstract>

#### **Un pas de plus vers l'utilisation de cellules T régulatrices en clinique?**

L'immunothérapie cellulaire voulant utiliser les propriétés immuno-suppressives des cellules T régulatrices (Treg) nécessite de grandes quantités de cellules. Trois papiers dans *Science Translational Medicine* décrivent des protocoles d'expansion ex vivo de Treg humains et étudient leur capacité immunosuppressive après transfert dans des modèles pathologiques de souris humanisées. L'équipe de Blazar décrit un protocole dans lequel les Treg CD4+CD25+ peuvent s'accroître d'un facteur 3000 : après isolation du sang périphérique, les Treg sont cultivés en présence de rapamycine, d'IL-2 et (l'originalité est là) de cellules présentatrices d'antigène « artificielles » dérivées de la lignée K562 (myelome humain). Ces cellules ont été préalablement modifiées par transfert de gène pour exprimer le récepteur de forte affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines (CD64) et la molécule costimulatrice CD86 (un des ligands de CD28, une molécule indispensable à l'expansion des Treg). De plus, ces cellules ont été « chargées » avec un anticorps anti-CD3, un composé du récepteur à l'antigène. Ces cellules sont donc des stimulateurs puissants des lymphocytes T en général, et des Treg en particulier. Les cellules Treg cultivées dans ces conditions maintiennent l'expression de foxp3 (une condition sine qua non à leur fonction effectrice régulatrice) même après congélation/décongélation et restimulation. Finalement, ces cellules réduisent significativement la mort associée à la maladie-du-greffon-contre l'hôte déclenchée par le transfert de cellules humaines chez des souris immunodéficientes. L'équipe de Wood et Buschell décrit elle la génération de Treg spécifiques du donneur à partir de cellules naïves chez la souris

grâce à l'utilisation de cellules dendritiques (DC) allogéniques et de l'inhibiteur de la phosphodiesterase cilostamide qui augmente la concentration intracellulaire d'AMPC en bloquant son hydrolyse ; cet enrichissement en AMPC est supposé augmenter le développement de Treg fonctionnels. La population Treg cultivée dans ces conditions bloque effectivement le rejet de peau allogénique chez la souris. Plus significativement, la même procédure a été appliquée aux cellules naïves humaines et les cellules Foxp3+ résultantes atténuent les signes cliniques de la vasculopathie chronique dans un modèle de transplantation d'artères chez la souris immunodéficente. Enfin, l'équipe de Sagoo décrit une nouvelle méthode d'expansion de Treg spécifique du donneur après stimulation avec des DC allogéniques. Les chercheurs ont tout d'abord enrichi leur culture en Treg en triant les cellules sur la base de CD69 et CD71. Après expansion in vitro, les Treg allogéniques sont des meilleurs protecteurs que les Treg polyclonaux face au rejet de peau allogénique chez la souris humanisée. Ces données consolident des données précédentes utilisant des Treg spécifiques du donneur. L'ensemble de ces données sont encourageantes, mais il reste à démontrer leur utilité quant à l'application clinique des Treg.

### Vecteurs viraux

Nat Rev Genet. 2011 May;12(5):341-55.

#### **Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges.**

Mingozi F, High KA.

Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur l'utilisation de vecteurs AAV in vivo dans des modèles animaux ou des patients sans jamais avoir osé le demander....

<http://www.nature.com/nrg/journal/v12/n5/full/nrg2988.html>

Mol Ther. 2011 Mar 1. [Epub ahead of print]

#### **Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer.**

Pulicherla N, Shen S, Yadav S, Debbink K, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Asokan A.

Parmi les différents sérotypes d'AAV, l'AAV9 occupe une position particulière. En effet, ce sérotype, qui a été isolé chez l'homme, possède la capacité de transduire l'ensemble des tissus de l'organisme lorsqu'il est injecté par voie systémique chez la souris. La variété de tissus ciblés inclut les muscles squelettiques et cardiaque et le système nerveux central. Cependant, une majorité des particules est également absorbée par le foie qui les capte lors de leur passage dans la circulation. Afin d'éviter que les particules d'AAV9 soient retenues dans le foie, les auteurs de cet article ont généré des variants de la capsid portant des mutations au niveau d'une région exposée à l'extérieur et en contact avec les récepteurs du virus. Parmi les mutants sélectionnés un montre une efficacité de transduction du foie réduite d'un facteur 10 à 25 avec un maintien d'un niveau de transduction du muscle squelettique et cardiaque identique à celui du virus AAV9 d'origine. Cette approche démontre la possibilité de manipuler la capsid virale pour dé-cibler certains tissus et ainsi restreindre l'expression du vecteur. Il reste maintenant à vérifier que les mutants sélectionnés chez la souris se comportent de la même façon dans d'autres espèces animales !

<http://www.nature.com/mt/journal/vaop/ncurrent/full/mt201122a.html>

Mol Ther. 2011 Mar 1. [Epub ahead of print]

**A Potential Role of Distinctively Delayed Blood Clearance of Recombinant Adeno-associated Virus Serotype 9 in Robust Cardiac Transduction.**

Kotchey NM, Adachi K, Zahid M, Inagaki K, Charan R, Parker RS, Nakai H.

Toujours à propos de l'AAV9, dans ce même numéro de Molecular Therapy vous trouverez un article qui s'intéresse aux mécanismes responsables de la capacité exceptionnelle de l'AAV9 de transduire plusieurs tissus après injection systémique. Contrairement à l'idée reçue selon laquelle cette propriété serait due à la capacité de l'AAV9 de passer de façon efficace à travers la barrière endothéliale, ce travail montre que cette propriété serait plutôt due à une persistance prolongée de ces capsides dans la circulation sous une forme stable et infectieuse et identifie une région de 13 acides aminés de la capside virale comme responsable de cette stabilité. Par ailleurs les auteurs montrent également que le passage de la barrière endothéliale est un obstacle majeur pour toutes les capsides d'AAV mais que l'AAV9 réussirait à la franchir grâce à sa persistance prolongée dans la circulation, probablement via un mécanisme de transcytose. Cette étude soulève tout un ensemble de questions parmi lesquelles celle du mécanisme responsable de la stabilité des capsides d'AAV9 dans le sang. Celle-ci pourrait résulter d'un équilibre entre l'affinité des capsides pour certains récepteurs ainsi que leur éventuelle reconnaissance par des facteurs sériques qui pourraient les « protéger » d'une absorption ou dégradation trop rapide. On sait déjà que les capsides de l'AAV fixent le complément...à quand l'identification d'autres facteurs sériques ?

<http://www.nature.com/mt/journal/vaop/ncurrent/full/mt20113a.html>

Mol Ther. 2011 Apr 12. [Epub ahead of print]

**Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates.**

Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR, Samulski RJ.

Parmi les barrières endothéliales, la plus restrictive est la barrière hémato-méningée qui empêche la diffusion passive de grosses molécules ou de virus présents dans le sang vers le système nerveux central (SNC). Plusieurs études ont montré que l'AAV9 peut transduire des neurones après injection intraveineuse chez la souris et le chat. Dans ce travail Gray *et al.* ont comparé l'efficacité de transduction de neurones dans un modèle murin ou de primate non humain. Ils montrent que, comme décrit auparavant par l'équipe de M. Barkats, des vecteurs AAV9 double brin transduisent de façon efficace des neurones du SNC après injection intra-veineuse chez la souris adulte. En revanche, la même étude conduite chez le primate indique des différences significatives avec notamment une moindre efficacité de transduction et un ciblage majoritaire de cellules gliales. De plus, les auteurs montrent que la présence d'anticorps anti-AAV9 neutralisants même à un titre faible constitue un obstacle important à la transduction du SNC. Ce travail souligne encore une fois la difficulté de transposer des résultats obtenus chez la souris vers d'autres espèces animales. Dans le cas de l'AAV9 ce problème est exacerbé par le fait qu'il s'agit d'un sérotype humain et pour lequel on s'attend à avoir un taux d'anticorps neutralisant de plus en plus important au fur à mesure que l'on passe de la souris vers l'homme.

<http://www.nature.com/mt/journal/vaop/ncurrent/full/mt201172a.html>

[J Mol Biol.](#) 2011 Apr 2. [Epub ahead of print]

**Conformational Changes in Adeno-Associated Virus Type 1 Induced by Genome Packaging.**

[Gerlach B, Kleinschmidt JA, Böttcher B.](#)

Au cours de ces dernières années les études de cristallographie ont permis de résoudre la structure de la capsid d'un certain nombre de sérotypes d'AAV. Globalement la capsid d'AAV est un icosaèdre avec trois axes de symétrie qui sont caractérisés par des structures et fonctions uniques. Cependant ces études ont pour l'instant fourni une image figée de la capsid qui ne rend pas compte des modifications qui peuvent survenir au cours de son entrée dans la cellule ou de l'encapsidation de l'ADN. Dans cette étude, l'équipe de J. Kleinschmidt s'est attachée à étudier par cryo-microscopie électronique la structure de la capsid de l'AAV1 au cours de l'encapsidation de l'ADN. Cette étude montre que la capsid d'AAV1 subit une modification conformationnelle au cours de l'encapsidation du génome notamment au niveau de sa surface interne et autour de ses deux axes de symétrie 5 et 3. Ces modifications sont probablement essentielles pour permettre les événements conformationnels qui ont lieu au cours du cycle infectieux, notamment lors de la sortie des capsides des endosomes et plus tard, lors de la decapsidation du génome.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.062>

### Vecteurs viraux et réponses immunes

Mol Ther. 2011 Jan;19(1):16-27. Epub 2010 Nov 30.

**The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products.**

Mays LE, Wilson JM.

Depuis leur entrée dans le monde du transfert de gène, les vecteurs AAV sont graduellement passés d'un statut de vecteur « inerte » du point de vue immunologique à celui d'un vecteur qui peut induire de réponses immunitaires et, en particulier, cellulaires à la fois contre le produit du transgène ou les composants viraux. Cette excellente revue retrace de façon historique les observations faites en termes d'induction de réponses immunes contre le produit du transgène codé par les vecteurs AAV en mettant l'accent sur l'induction de réponses T CD8+ qui varient en fonction du sérotype d'AAV, de la voie d'injection et bien entendu du type de transgène qui est produit. A lire absolument pour entrer dans le monde complexe des relations vecteur AAV/système immunitaire

<http://www.nature.com/mt/journal/v19/n1/full/mt2010250a.html>

Hum Gene Ther. 2011 Apr 8. [Epub ahead of print]

**Liver Gene Transfer with Vectors based on Adeno-associated Virus 8 in Non-human Primates:**

**Impact of Pre-existing Immunity.**

Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM.

Contrairement à d'autres vecteurs viraux, tels que ceux dérivés d'HIV (lentivecteurs), l'utilisation de vecteurs AAV in vivo chez l'homme est confrontée au problème de la pré-existence chez la plupart des individus d'un large spectre d'anticorps dirigés contre les capsides d'AAV. L'effet d'anticorps neutralisants sur la transduction in vivo a été essentiellement évalué dans des modèles expérimentaux dans lesquels des animaux naïfs étaient pré-injectés avec des particules d'AAV d'un sérotype donné avant d'administrer le vecteur. Cependant dans ce cas l'immunité générée avant l'administration du vecteur est souvent très spécifique d'un sérotype donné et pas représentative quantitativement et qualitativement de celle générée « naturellement » au cours des multiples infections avec des AAV qui peuvent survenir dans la vie d'un individu. Dans cette étude, l'équipe de Jim Wilson a analysé l'effet d'anticorps anti AAV 8 « naturels » présent dans une cohorte de 21 primates non humains sur le niveau de transduction du foie par un vecteur AAV8-GFP. Ils montrent que bien que dans des animaux naïfs le niveau de transduction soit très important, celui-ci est



significativement réduit lorsque le titre devient supérieur à 1 :10. Dans ce cas on observe également une redistribution du vecteur du foie vers la rate et, en particulier, dans les cellules dendritiques folliculaires présentes dans cet organe. Ces données permettent de définir avec précision le niveau en anticorps neutralisants autorisant une transduction du foie pour des essais cliniques.

<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2011.031>