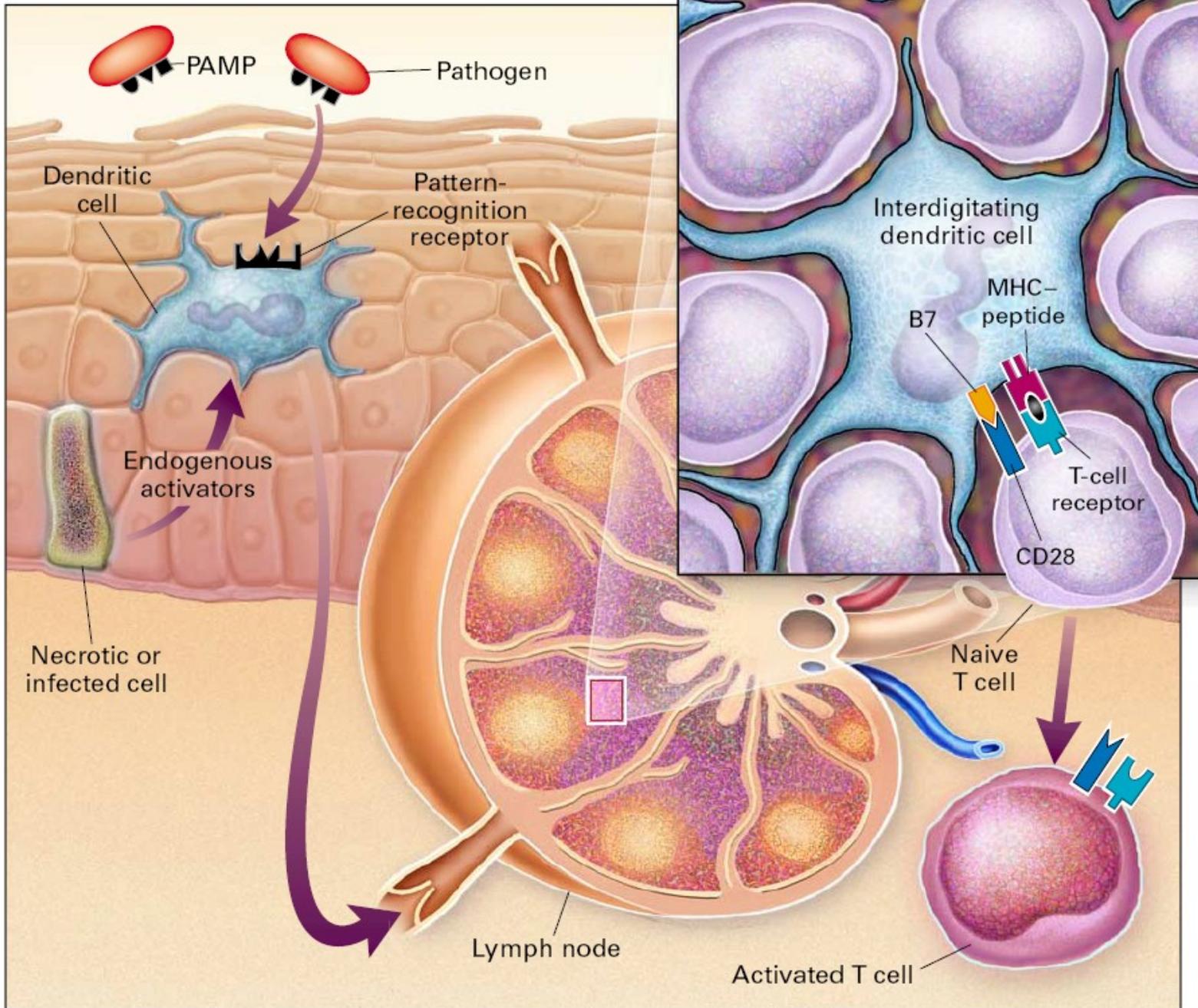




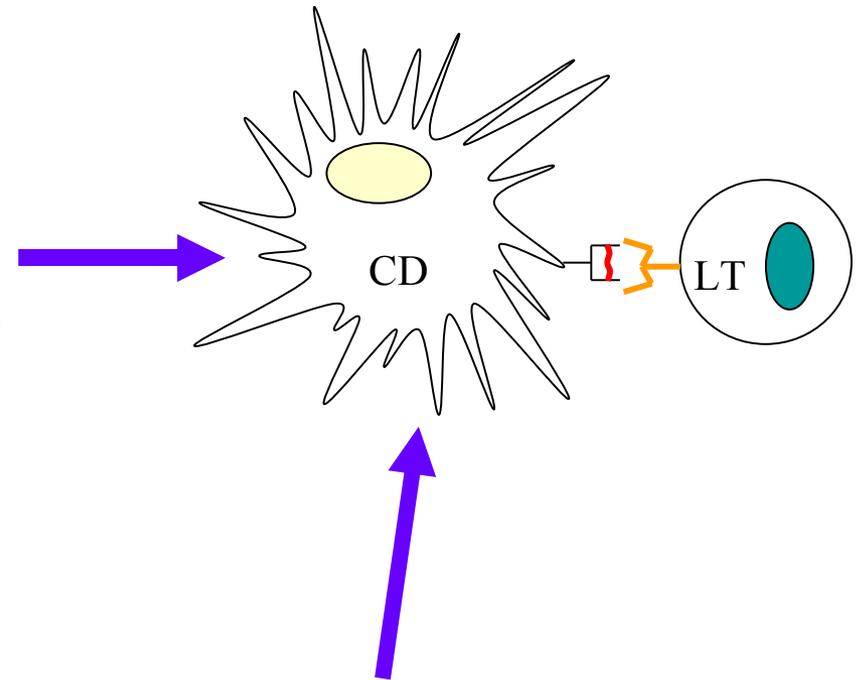
Immunothérapie par vecteur bactérien vivant :  
utilisation du système de sécrétion de type III  
de *Pseudomonas aeruginosa*

Olivier Epaulard  
Laboratoire TheREx, équipe BacVac  
TIMC-IMAG UMR CNRS 5525  
Grenoble



# Conditions de l'activation lymphocytaire par la cellule dendritique : *the danger theory*\*

- Captation d'antigène et apprêtement pour présentation
  - Aux T CD4+ (antigènes phagocytés)
  - Aux T CD8+ (antigènes produits par la cellule)
- Signaux de « danger » : ligands des Toll-like receptors (TLR)
  - TLR2 : peptidoglycane
  - TLR3 : ADN simple brin (viral)
  - TLR4 : LPS
  - TLR5 : flagelline
  - TLR9 : ADN bactérien



Expression par la cellule dendritique de molécules de costimulation

\* Polly Matzinger, 1994 (*Ann Rev Immunol*)

# Principe de la vectorialisation

- Utilisation de la bactérie

- Comme source / agent de synthèse
- Comme véhicule
- Comme mode de délivrance précis
- Comme adjuvant (ligands des TLR)

de la protéine-cible

- Pour déclencher une réaction T cytotoxique contre les cellules exprimant cette protéine (tumeur, infection virale ...)

THE  
AMERICAN JOURNAL  
OF THE MEDICAL SCIENCES.

MAY, 1893.

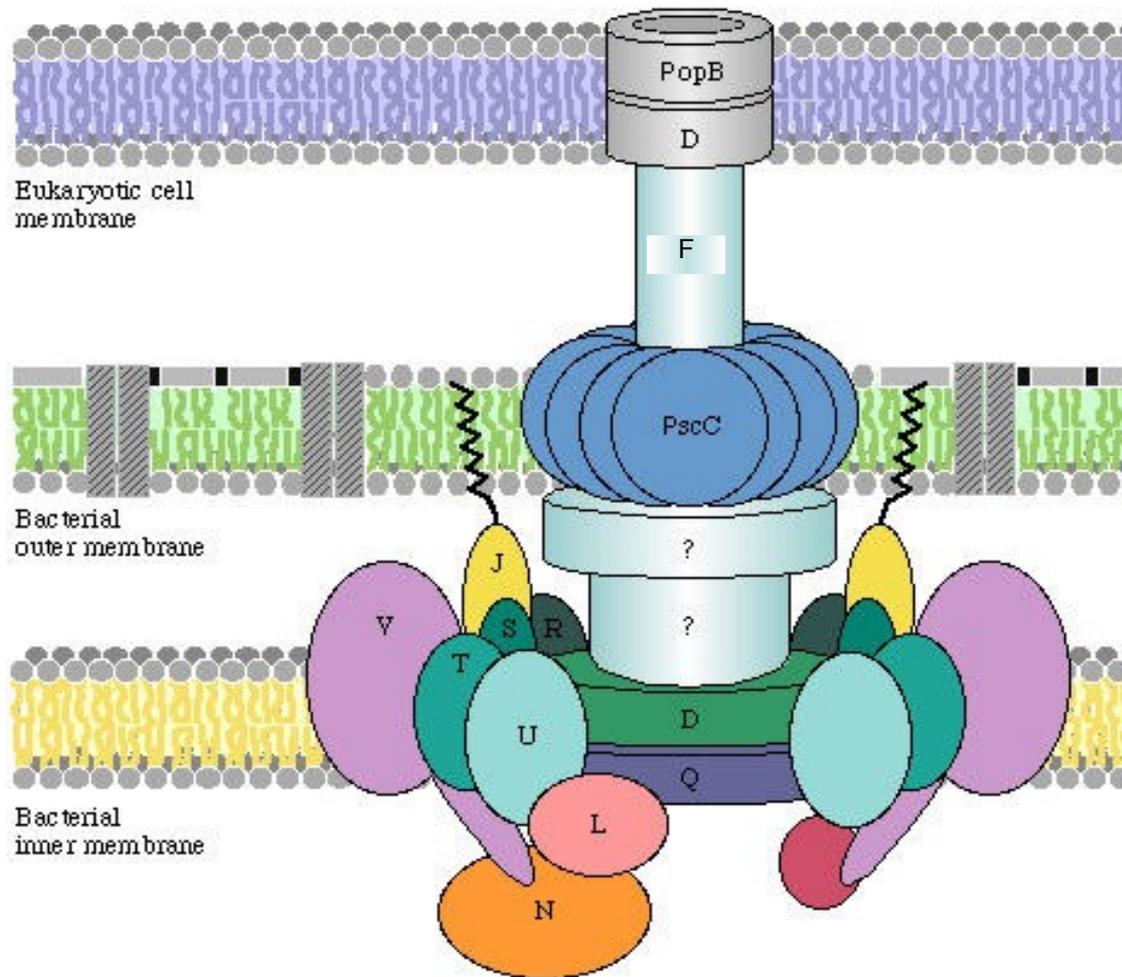
---

THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED  
INOCULATIONS OF ERYSIPELAS: WITH A REPORT OF  
TEN ORIGINAL CASES.<sup>1</sup>

BY WILLIAM B. COLEY, M.D.,

ASSISTANT SURGEON TO THE HOSPITAL FOR RUPTURED AND CRIPPLED; INSTRUCTOR IN SURGERY  
IN THE POST-GRADUATE MEDICAL SCHOOL, NEW YORK.

# Systeme de secretion de type III

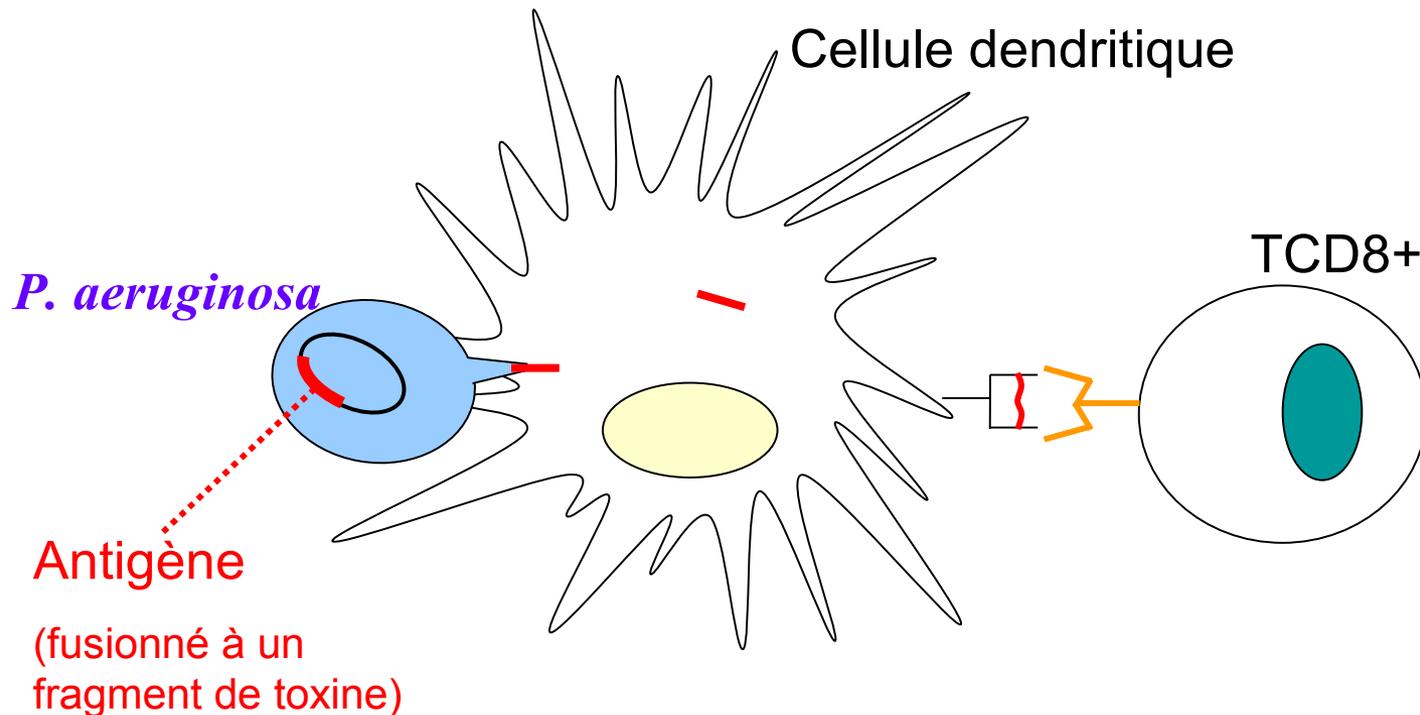


© Dara Frank

Kubori Science  
1998

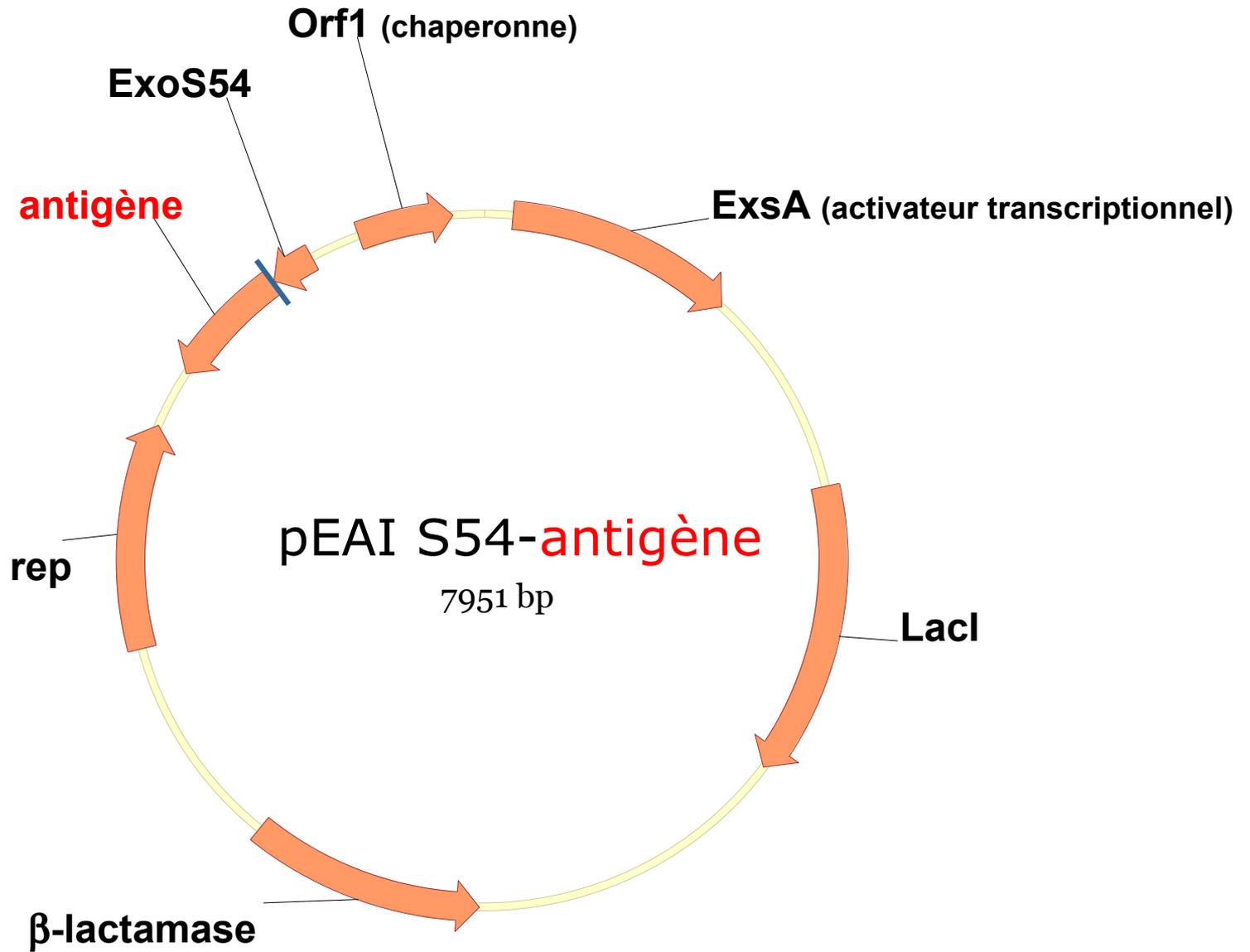
Toxines concernées chez *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoU, ExoY

# Le principe : vectorisation de protéines antigéniques par le SSTT



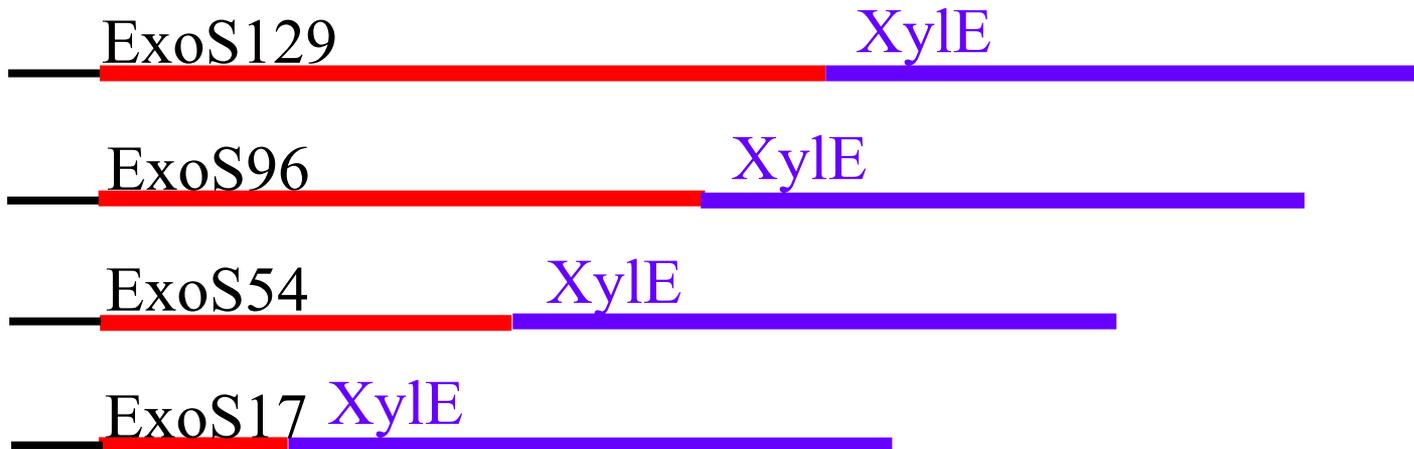
# *Pseudomonas aeruginosa*, SSTT et délivrance de protéines

- Élaboration de constructions génétiques
- Fusion toxine ExoS – protéine d'intérêt sous la dépendance du promoteur de la toxine
- Placée sur un plasmide
- Associé à un système d'hyperproduction de l'activateur transcriptionnel du gène de la toxine
- Transfert du plasmide dans la souche CHA de *P. aeruginosa*



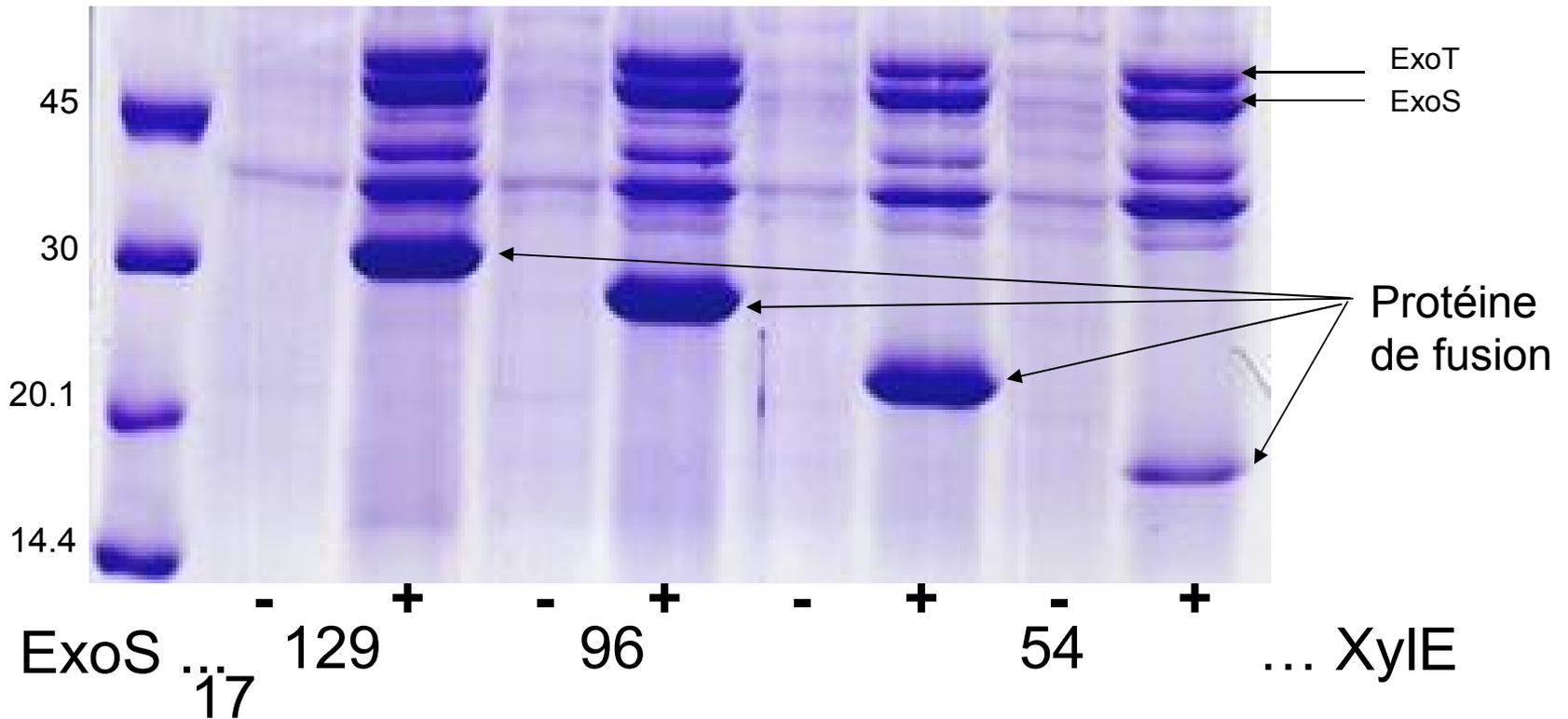
# Détermination de la séquence d'ExoS nécessaire à la sécrétion

- Élaboration de plusieurs constructions génétiques : fusion de **différentes longueurs d'ExoS** avec la **protéine XylE**



- Introduction de la construction dans la souche et étude de la sécrétion des fusions

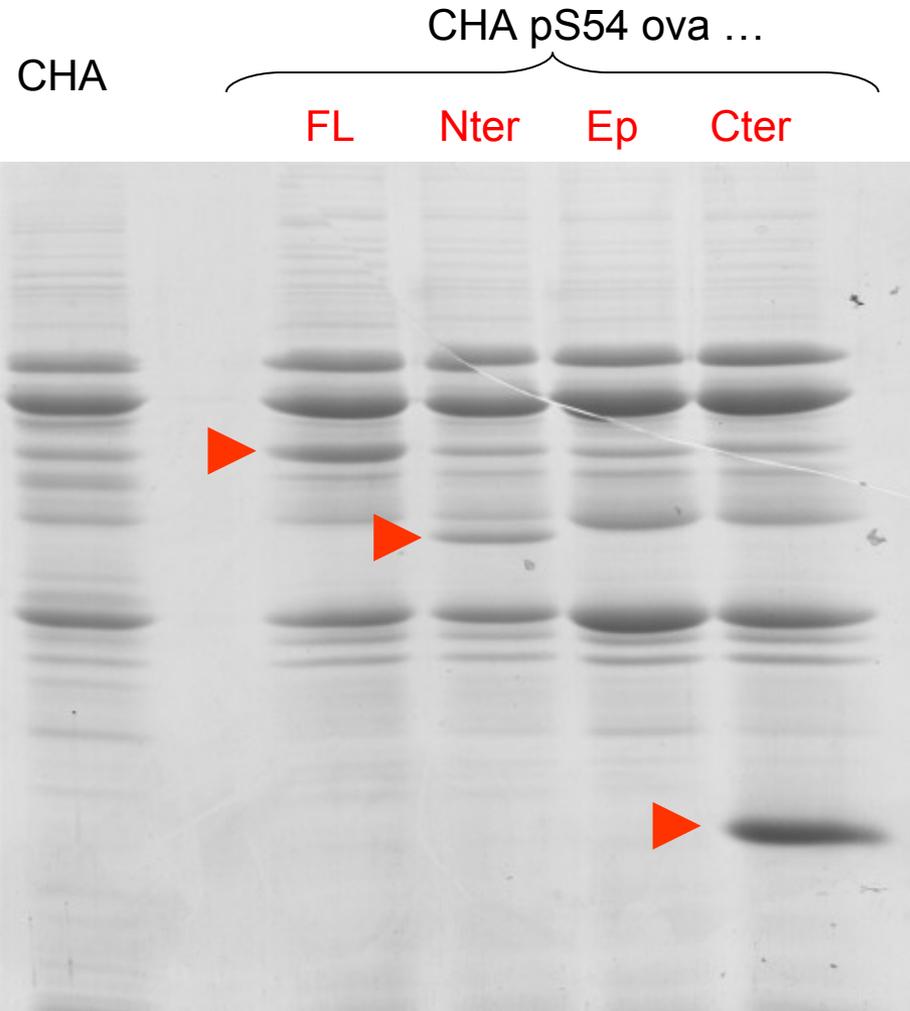
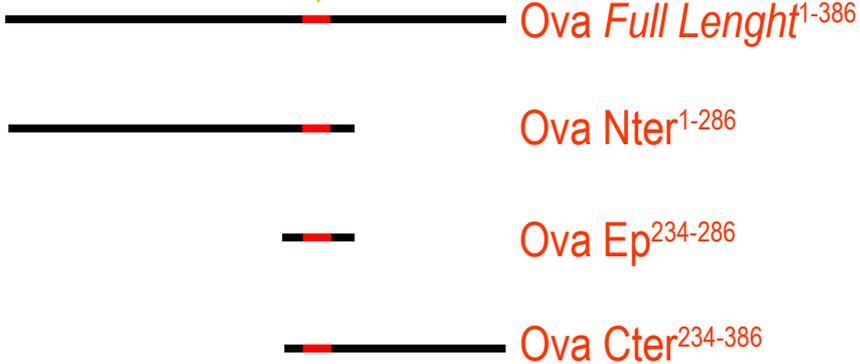
# Détermination de la séquence d'ExoS nécessaire à la sécrétion



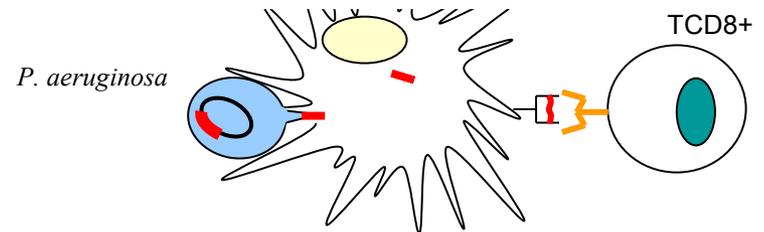
Analyse par SDS-PAGE du surnageant de culture  
avec ou sans induction du SSTT

# Étude de la sécrétabilité d'une fusion ExoS-antigène d'étude : ovalbumine

Épitope T CD8



# Étude *in vitro* de la délivrance d'antigène



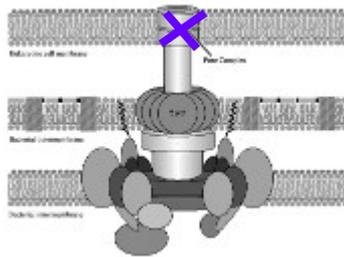
- Antigène modèle : ovalbumine
- *P.aeruginosa* délivrant ExoS54Ova
- Cellules dendritiques murines
- TCD8 + murins
  - spécifique d'un peptide de l'ovalbumine
  - Avec un gène rapporteur de son activation

# Étude *in vitro* de la délivrance d'antigène

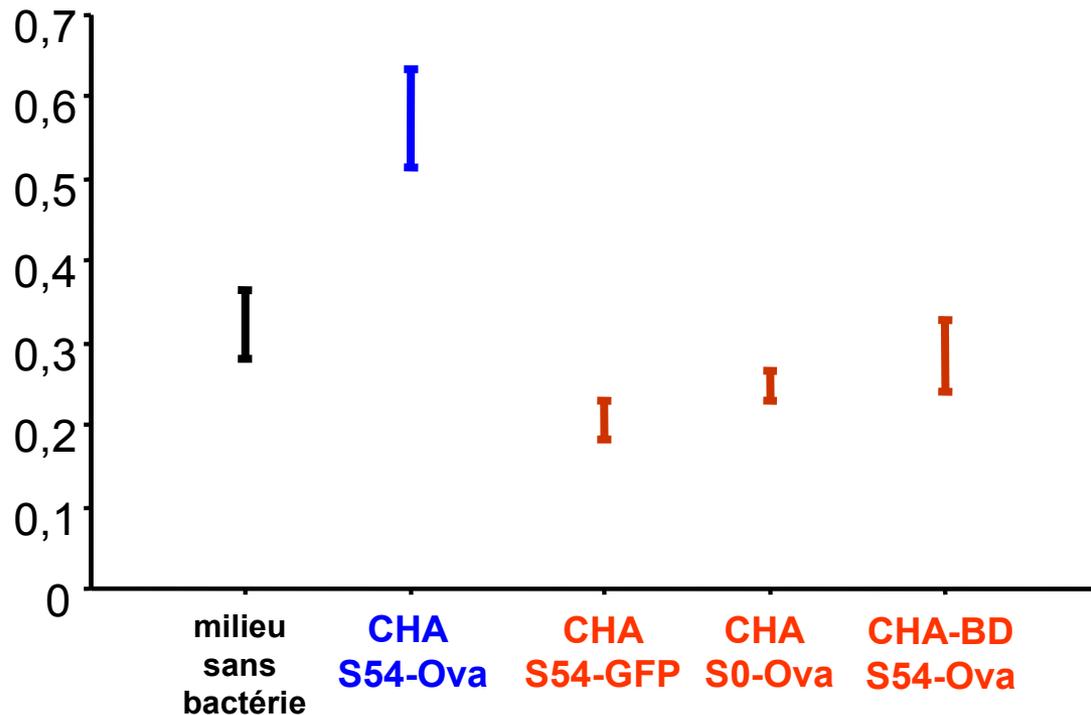
- souche vectorielle :  
CHA S54Ova

- Contrôles :

- Souche mutée dans le SSTT (CHA-BD)



- Souche synthétisant sans la sécréter l'ovalbumine (pas de fusion avec la toxine)
- Souche délivrant un autre Ag (GFP)



# *P. aeruginosa*, SSTT et délivrance d'antigène :

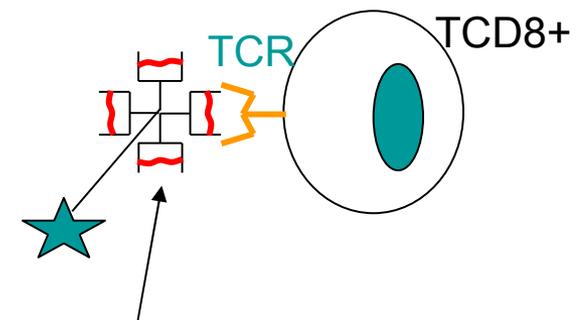
## étude *in vivo* (modèle murin)

- Antigène modèle : ovalbumine
  - Même souches qu'*in vitro*
  - Injection du vecteur  
puis quantification des TCD8+ anti-ovalbumine
  - Injection du vecteur  
puis implantation d'une tumeur exprimant l'ovalbumine :  
mélanome B16-Ova
-

# Génération de T CD8+ anti-ovalbumine

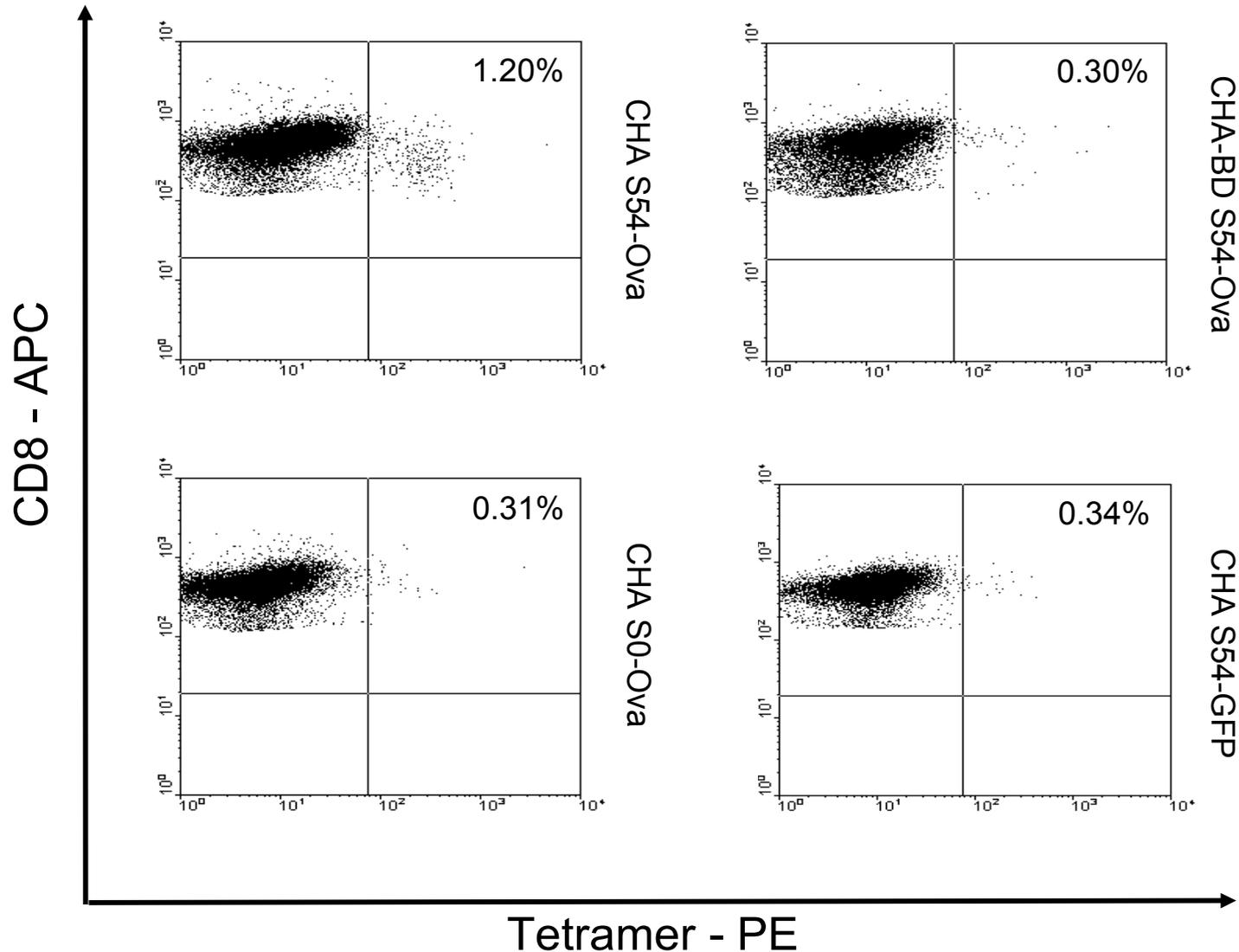
- Vaccination J1 et J7 ( $5 \cdot 10^6$  bactéries)
- Sacrifice et recueil des splénocytes à J13
- Quantification en cytométrie de flux par double marquage :
  - CD8+
  - Tétramère

(marquant les TCR spécifiques de l'Ova)



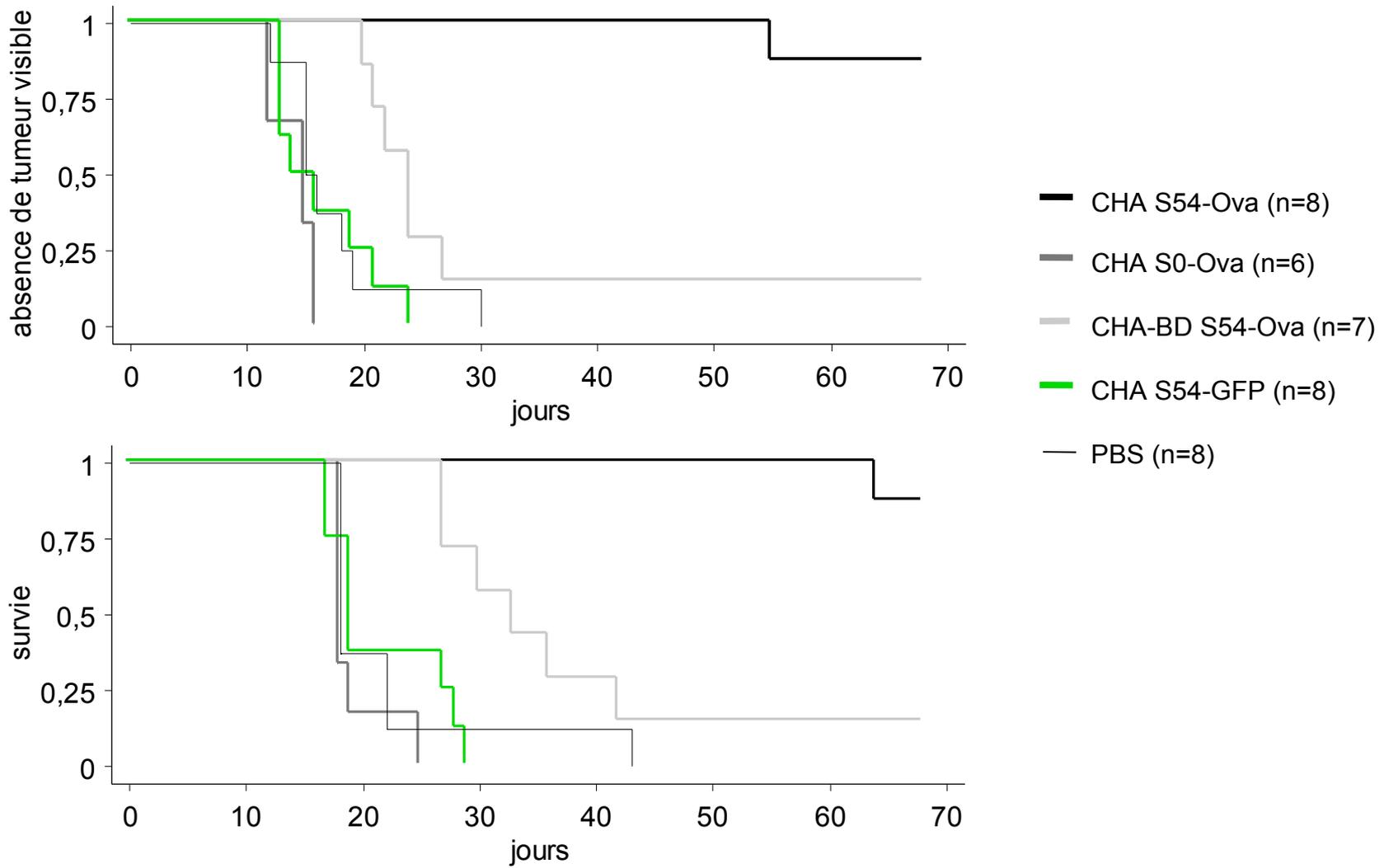
Tétramère de CMH-I/peptide

# Génération de T CD8+ anti-ovalbumine



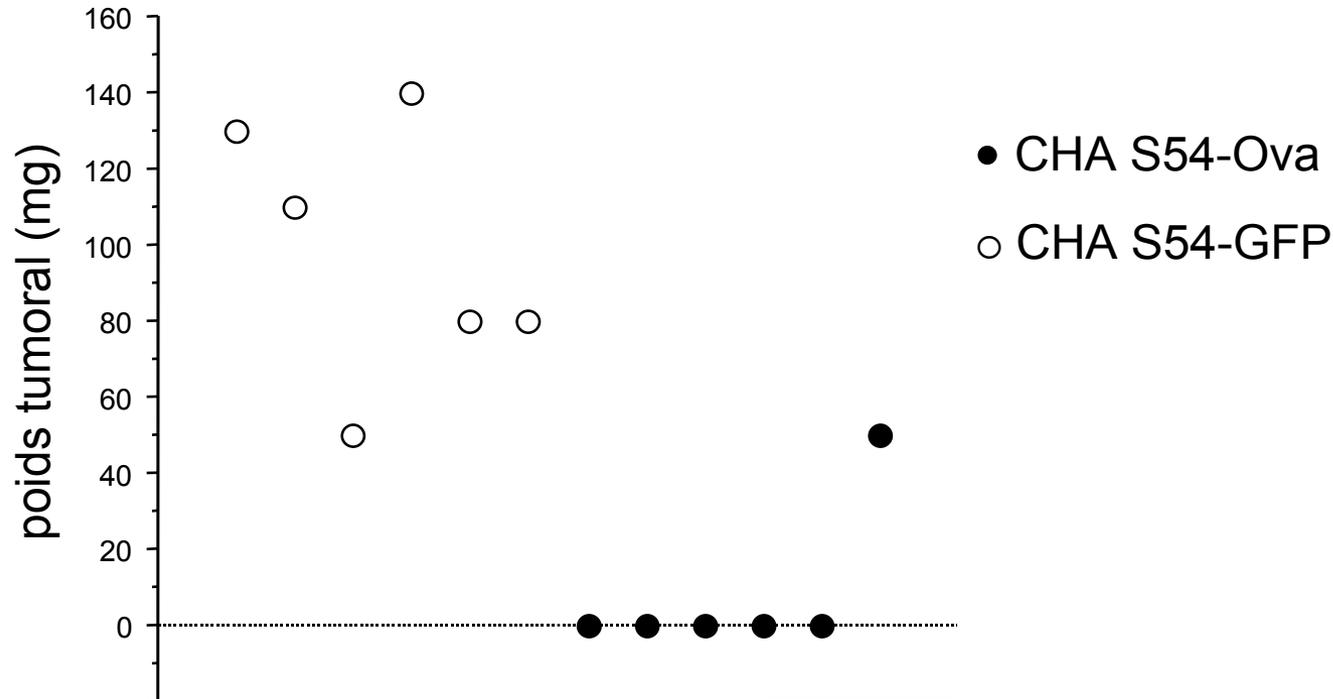
# Protection anti-tumorale

- Vaccination SC (flanc D) à **J1** et **J8** ( $5 \cdot 10^6$  bactéries)
- Implantation de B16-Ova ( $2 \cdot 10^5$  cellules) SC (flanc G) à **J15**



# Vaccination curatrice

- Injection IV de B16-Ova à **J1** ( $10^5$  cellules)
- Vaccination SC à **J5** et **J13** ( $5 \cdot 10^6$  bactéries)
- Sacrifice à **J16** et quantification des masses thoraciques métastatiques



# Poursuite de l'optimisation du vecteur

- Délétion de gènes de virulence
  - Toxines du SSTT
  - Agents du quorum sensing
- Délétion de gène de ménage
  - Rendre la bactérie auxotrophe
  - Limiter la croissance dans l'organisme vacciné
- Pentamutant actuellement à l'étude
  - DL50 500 fois plus élevée
  - Efficacité à doses non toxiques

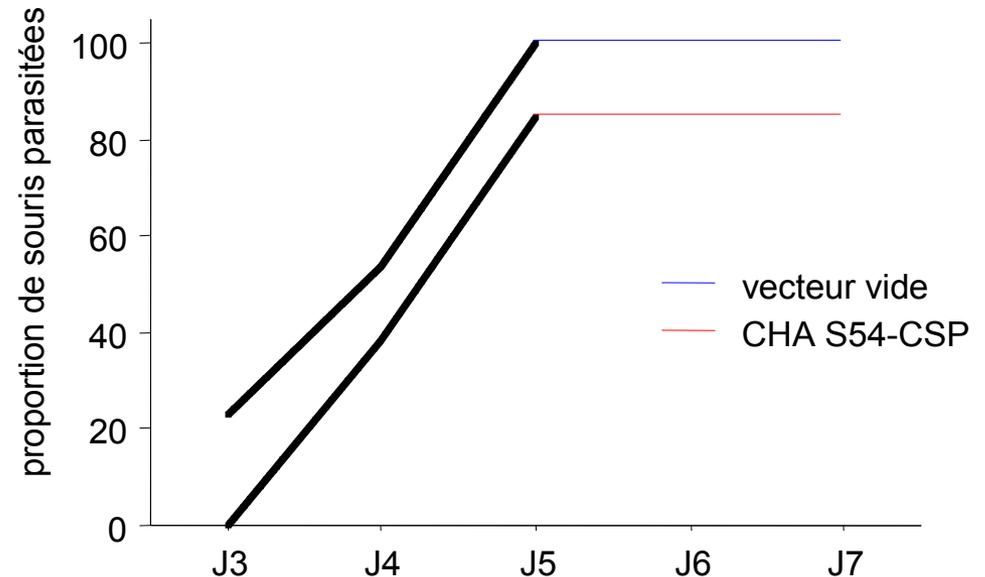
---

# Un autre modèle : immunothérapie anti-plasmodiale

- But : déclencher une réaction lymphocytaire T cytotoxique contre les hépatocytes infectés par les sporozoïtes après inoculation par le moustique
  - Vectorisation d'antigènes de la phase hépatocytaire de l'infection
    - Protéine circumsporozoïtaire (CSP)
    - Autres
-

# Protection anti-plasmodiale

- Modèle murin
- *P. yoelii*
- Vaccination J1-J7
- Inoculation de 100 sporozoïtes à J15
- Suivi de la parasitémie



- Quantification de l'infiltrat hépatique TCD8+

---

# Perspectives et développement en cours

- Tumeur cérébrale
    - Étude de la vaccination anti-glioblastome
    - Antigènes natifs (identiques aux tumeurs humaines)
  - Paludisme
    - Combiner la vectorisation d'épitopes T4 et T8
    - Améliorer le schéma d'injection
  - Vers une utilisation chez l'humain ?
    - Travaux en ce sens avec *Salmonella* aux USA
-

## ■ TheREx - Grenoble

- Mathilde Guillaume
- Madiha Derouazi
- Lauriane Quénée
- Carole Margerit
- Anne-Catherine Bretz
- Benoît Polack
- Bertrand Toussaint

## ■ U548 / IAB Grenoble

- Nabil Bosco
- Christian Villiers
- Patrice Marche

## ■ U318 - UJF

- Laurent Pelletier
- François Berger

## ■ R&D EFS Rhône-alpes

- Joël Plumas
- Laurence Chaperot

## ■ U511 / P&M Curie

- Jean-François Franetich
- Dominique Mazier

## ■ EA2689, Lille

- Rozenn Le Berre
- Benoît Guery

## ■ U482 - Lyon

- Eric Hatterer
- Nelly Noraz