

N° D'ORDRE : 3340

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER (TOULOUSE III)

en vue de l'obtention du

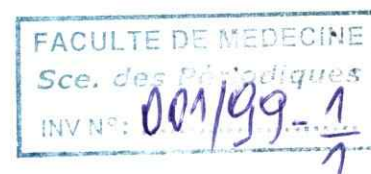
DOCTORAT D'UNIVERSITE
spécialité : Immunopharmacologie

par MAHA AYYOUB



Activation des lymphocytes T cytotoxiques antitumoraux par des ligands antigéniques non naturels : approches pharmacologique et structurale.

Soutenue le 29 Janvier 1999



Jury :

M. J. CROS, Professeur - Université Toulouse III

Mme H. GRAS-MASSE, Professeur - Université Lille II

M. P. ROMERO, Associate member - Institut Ludwig - Lausanne

M. G. FAVRE, Professeur - Université Toulouse III

M. B. VAN DEN EYNDE, Associate member - Institut Ludwig - Bruxelles

M. J. E. GAIRIN, Directeur de recherche, CNRS, Toulouse

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, UPR 9062 CNRS,
205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PREMIÈRE PARTIE	
I - L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE.	4
I - 1 - Les antigènes spécifiques des tumeurs.	5
I - 1.1 - Antigènes communs spécifiques des tumeurs.	6
I - 1.2 - Antigènes de différenciation.	8
I - 1.3 - Antigènes provenant de mutations et antigènes uniques.	10
I - 1.4 - Les antigènes de tumeur potentiels (candidats).	11
I - 1.4.1 - Oncogènes et gènes suppresseurs des tumeurs.	12
I - 1.4.2 - Les virus associés aux tumeurs.	13
I - 2 - Choix des antigènes comme cibles ou agents thérapeutiques potentiels en immunothérapie antitumorale.	14
I - 2.1 - Spécificité de l'antigène et réactions auto-immunes.	16
I - 2.2 - Rôle de la tolérance dans la réponse immunitaire antitumorale.	17
I - 2.3 - Rôle des antigènes spécifiques des tumeurs dans le rejet tumoral in vivo.	18
II - RECONNAISSANCE DES ANTIGÈNES PAR LES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES.	20
II - 1 - Cellule cible ou cellule présentatrice de l'antigène (APC).	20
II - 2 - Les molécules de CMH de classe I.	22
II - 2.1 - Les peptides présentés par les molécules de CMH de classe I.	24
II - 2.2 - Structure du complexe CMH-peptide	25
II - 2.3 - Paramètres de liaison CMH-peptide et leur influence sur l'immunogénicité des peptides.	26
II - 3 - Les lymphocytes T cytotoxiques.	27
II - 3.1 - Le récepteur des lymphocytes T cytotoxiques.	27
II - 3.2 - L'interaction entre le R _c T et son ligand.	28
II - 3.3 - Activation des CTL.	29
III - LES PEPTIDES ANTIGÉNIQUES TUMORAUX COMME MODULATEURS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTITUMORALE.	31
III - 1 - Spécificité de la réponse immunitaire induite par les peptides.	32
III - 2 - La structure d'un peptide antigénique est modulable.	32
III - 3 - L'efficacité des peptides in vivo peut être limitée par une mauvaise biodisponibilité.	33
III - 4 - Équilibre entre l'activation du système immunitaire et l'induction de la tolérance.	34

IV - OBJECTIFS DU TRAVAIL.	36
-----------------------------------	-----------

DEUXIÈME PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
-----------------------------	-----------

I - Lignées cellulaires.	40
II - Synthèse, purification et analyse des peptides.	41
III - Obtention de CMH de classe I (HLA-A1) soluble et fonctionnel.	41
III - 1 - Préparation des colonnes d'affinité.	42
III - 2 - Purification de HLA-A1.	43
IV - Iodation de la β 2-microglobuline.	43
V - Dégradation des peptides.	44
V - 1 - Essai de dégradation des peptides dans le sérum.	44
V - 2 - Analyse des peptides par chromatographie liquide haute performance (HPLC).	44
V - 3 - Analyse des peptides par spectrométrie de masse en mode d'ionisation electrospray (ESI-MS).	45
VI - Liaison des peptides au CMH de classe I HLA-A1.	46
VI - 1 - Affinité de liaison.	46
VI - 1.1 - Stabilisation du CMH à la surface de lignées déficientes en TAP	46
VI - 1.2 - Assemblage des complexes peptide-CMH.	47
VI - 2 - Stabilité des complexes peptide-CMH.	47
VII - Activation des lymphocytes T cytotoxiques.	48
VII - 1 - Stimulation des clones de lymphocytes T humains.	48
VII - 2 - Essais de cytotoxicité.	48
VIII - Modélisation moléculaire.	49

RÉSULTATS ET DISCUSSION	50
--------------------------------	-----------

I - Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse des mécanismes de dégradation des antigènes tumoraux présentés par le CMH de classe I.	51
--	-----------

I - 1 - L'ionisation par electrospray (ESI).	52
I - 2 - Le couplage HPLC-ESI/MS permet une détermination précise du mécanisme de dégradation des peptides.	54
I - 2.1 - Séparation et identification des produits de dégradation de P198 dans le sérum.	54
I - 2.2 - Identification par HPLC/ESI-MS de produits de dégradation indécélables en UV.	56
I - 2.3 - Etablissement du mécanisme de dégradation du peptide P198 dans le sérum.	59

I - 3 - Des modifications localisées protègent le peptide de la dégradation par les peptidases.	61
I - 3.1 - Identification des produits de dégradation de MAGE-3.A1 par HPLC/ESI-MS et établissement du modèle de dégradation.	61
I - 3.2 - Dégradation des analogues modifiés de MAGE-3.A1.	64
I - 4 - Discussion.	67
II - Application à la conception d'analogues non-naturels, stables et antigéniques de l'antigène tumoral humain MAGE-1.A1.	70
II - 1 - Dégradation de MAGE-1.A1.	71
II - 1.1 - Identification des produits de dégradation de MAGE-1.A1 par HPLC/ESI-MS et établissement du modèle de dégradation.	71
II - 1.2 - Conception d'analogues non-naturels de MAGE-1.A1 basée sur le modèle de dégradation.	73
II - 2 - Modifications structurales et résistance aux peptidases.	74
II - 3 - La liaison HLA-A1 / MAGE-1.A1 peut tolérer des modifications structurales du peptide antigénique.	78
II - 5 - Modélisation moléculaire de la liaison de MAGE-1.A1 et ses analogues à HLA-A1.	85
II - 6 - Discussion.	87
III - Augmentation de l'efficacité de présentation de l'antigène tumoral humain MAGE-1.A1 par HLA-A1 par la stratégie des peptides chimères.	94
III - 1 - Liaison des peptides chimères à HLA-A1.	97
III - 1.1 - Essai de liaison.	97
III - 1.2 - L'affinité de liaison à HLA-A1 est peu sensible à la séquence du peptide.	100
III - 1.3 - La stabilité du complexe peptide-HLA-A1 est dépendante de l'acide aminé en position 2.	102
III - 2 - La substitution en position 2 préserve la reconnaissance des cellules cibles par les CTL spécifiques de MAGE-1.A1.	104
III - 3 - Modélisation moléculaire.	106
IV - Discussion.	108
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.	110
I - Les modifications structurales peuvent conserver l'antigénicité des peptides .	111
II - Signification des peptides antigéniques modifiés in vivo.	112
III - Utilisation des peptides en immunothérapie.	113
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115

RÉSUMÉ

Les cellules tumorales portant des antigènes de tumeur peuvent être reconnues et lysées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces antigènes sont des peptides de 8 à 11 acides aminés présentés à la surface des cellules tumorales par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Ils représentent des agents thérapeutiques potentiels en immunothérapie antitumorale. Cependant, leur sensibilité aux peptidases et/ou leur faible immunogénicité peuvent limiter leur utilisation.

Le but du travail était double : i) élucider les mécanismes de dégradation des antigènes dans les milieux biologiques et comprendre les paramètres impliqués dans la présentation des peptides antigéniques par le CMH. ii) sur la base de ces connaissances, concevoir des analogues non naturels de ces antigènes.

Deux approches rationnelles ont été développées en utilisant comme modèle l'antigène tumoral humain MAGE-1.A1 exprimé dans le mélanome et d'autres tumeurs mais pas dans les tissus sains. Dans la première approche, la compréhension des mécanismes de dégradation du peptide MAGE-1.A1 nous a permis de concevoir des analogues portant des modifications structurales minimales mais suffisantes pour conférer la résistance aux peptidases ($t_{1/2} > 24$ heures) sans altérer l'antigénicité du peptide. La deuxième approche est basée sur la connaissance des paramètres de liaison de MAGE-1.A1 au CMH qui nous ont permis de synthétiser des analogues ayant de meilleures propriétés de liaison.

Nous avons montré qu'il était possible en utilisant des modifications de la structure de MAGE-1.A1 de lui conférer de nouvelles propriétés, dans le but de l'utiliser comme agent thérapeutique, sans modifier sa spécificité antigénique. Nos résultats sont également discutés en terme d'application en immunothérapie antitumorale.