

Réduire l'immunosuppression par les Treg avec des anticorps monoclonaux anti-GARP

Sophie Lucas

Institut de Duve, avenue Hippocrate, 74,
1200 Bruxelles, Belgique.
sophie.lucas@uclouvain.be

► Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T CD4⁺ immunosuppresseurs, indispensables au maintien de la tolérance immunitaire [1]. Les Treg exercent néanmoins un rôle délétère dans le cancer et les maladies infectieuses, en inhibant des réponses immunitaires bénéfiques. Réduire transitoirement le nombre ou la fonction des Treg représente une approche prometteuse d'immunothérapie, qui n'a pourtant connu que peu de succès jusqu'ici, et ce, pour deux raisons principales [11].

La première découle de l'absence de marqueur protéique permettant d'étudier et de cibler ces cellules sans ambiguïté chez l'homme. Si le facteur de transcription FOXP3 (*forkhead box P3*) est exprimé exclusivement par les Treg chez la souris, chez l'homme, il est aussi exprimé dans de nombreux lymphocytes non régulateurs activés. D'autre part, les protéines abondamment présentes à la surface des Treg, parfois utilisées comme marqueurs de ces cellules, sont également présentes sur les lymphocytes T non régulateurs activés. C'est le cas des protéines CD25¹, CTLA (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*)-4, GITR (*glucocorticoid-induced TNFR family related gene*) et OX40 (CD134, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 4* [TNFRSF4]), par exemple. Des anticorps monoclonaux (Acm) qui reconnaissent ces protéines ne ciblent donc pas seulement les Treg, mais également les lymphocytes T activés, ce qui complique l'interprétation de leurs effets sur la modulation des réponses immunes.

La seconde provient de l'existence, chez la souris en tout cas, de divers mécanismes d'immunosuppression par les Treg, comme la production de cytokines immunosuppressives, la diminution de la capacité des cellules présentatrices d'antigènes à stimuler les lymphocytes T, le transfert d'AMP cyclique à travers les jonctions communicantes², ou encore la production d'adénosine. L'importance d'un mécanisme particulier semble dépendre du contexte et du type de réponse immunitaire à supprimer. Lequel de ces mécanismes, ou d'autres encore non identifiés, joue un rôle prépondérant chez l'homme n'est pas connu.

Pour étudier les mécanismes d'immunosuppression par les Treg humains, nous avons dérivé des clones de Treg, afin de contourner la difficulté inhérente à l'isolement répété de ces cellules sanguines rares, difficilement identifiables, et présentant une fonction suppressive peu reproductible *in vitro*. Un clone est défini comme Treg s'il possède une marque épigénétique stable, qui ne s'établit que dans les Treg complètement différenciés chez l'homme et chez la souris. Cette marque correspond à la déméthylation d'une région régulatrice du gène *FOXP3* [1, 2]. Nos clones Treg expriment FOXP3, sont suppresseurs *in vitro*, et se sont révélés une source de cellules remarquablement stables et pures pour étudier la fonction immunosuppressive des Treg humains. L'analyse

de leur profil transcriptionnel a montré qu'en réponse à une stimulation du récepteur T, les Treg humains, mais pas les autres types de lymphocytes T, produisent la forme active du TGF-β1 (*transforming growth factor-β1*) [2]. Les souris *Tgfb1*^{-/-} souffrent d'un syndrome auto-immunitaire léthal. Il semblait donc raisonnable de postuler que la production de cette cytokine par les Treg contribue à leur fonction suppressive. Cependant, la suppression par les Treg requiert des contacts cellulaires, ce qui suggère plutôt un mécanisme impliquant des protéines membranaires. Mais nous avons ensuite observé que l'induction d'un signal dépendant du TGF-β1 dans des lymphocytes T en présence de Treg requérait également des contacts cellulaires, indiquant que le TGF-β1 actif est produit à proximité de la surface des Treg [2]. Ces observations nous ont conduits à examiner en détails les mécanismes d'activation du TGF-β1 par les Treg humains. En effet, la plupart des cellules produisent des formes inactives du TGF-β1 mais seul un petit nombre sont capables d'activer la cytokine, via des mécanismes très contrôlés qui varient d'un type cellulaire à l'autre [3]. Toutes les cellules immunitaires produisent le précurseur du TGF-β1, le proTGF-β1 qui est clivé pour générer le TGF-β1 latent dont le fragment carboxy-terminal, correspondant au TGF-β1 mature, reste lié de manière non covalente au fragment amino-terminal appelé LAP (*latency associated peptide*). Le TGF-β1 latent est inactif parce que le LAP empêche la liaison du TGF-β1 mature à son récepteur

² Les jonctions communicantes (ou *gap junctions* en anglais) sont des structures membranaires permettant la diffusion intercellulaire de petites molécules.

¹ CD25 est la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2.

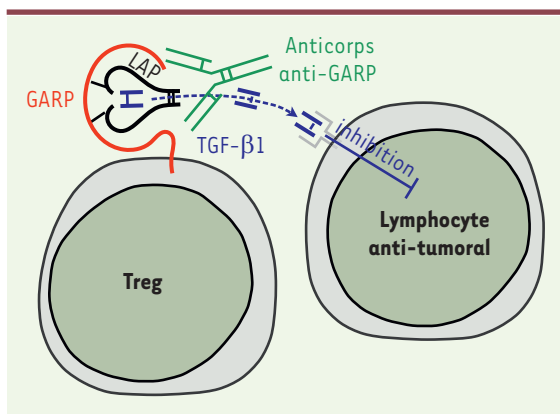


Figure 1. Mode d'action des anticorps anti-GARP. Le TGF- β 1 actif libéré des complexes GARP/TGF- β 1 à la surface des Treg inhibe les lymphocytes T à proximité. Des anticorps anti-GARP peuvent bloquer la production de TGF- β 1 actif par les Treg, et donc réduire l'activité immunosuppressive de ces derniers *in vivo*.

(Figure 1). Une étape supplémentaire est en effet nécessaire pour libérer le TGF- β 1 mature du LAP. Avec d'autres équipes, nous avons montré que les Treg stimulés, mais pas les autres types de lymphocytes T, présentent le TGF- β 1 latent à leur surface grâce à sa liaison à une protéine transmembranaire appelée GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*) [4, 5]. Nous avons postulé, et ensuite démontré, que GARP contribuait à la production de TGF- β 1 actif par les Treg. Nous avons obtenu 31 nouveaux anticorps anti-GARP, dont 2 se sont avérés capables d'inhiber la production de TGF- β 1 actif par les Treg humains. Ces deux anticorps reconnaissent un épitope conformationnel qui requiert les acides aminés situés en position 137-139 au sein des complexes GARP/TGF- β 1 (GARP₁₃₇₋₁₃₉). Les autres anticorps, qui ne bloquent pas l'activation du TGF- β 1, reconnaissent d'autres épitopes. Nous avons mesuré l'activité de ces anticorps anti-GARP bloquants chez des souris immunodéficientes, greffées avec des PBMC (cellules mononucléées isolées du sang périphérique humain). Ces souris développent une maladie du greffon contre l'hôte (en anglais, *graft-versus-host disease*, GVHD) provoquée par l'activité des lymphocytes T humains greffés contre les tissus de la souris receveuse. Le co-transfert de Treg autologues³ humains permet d'atténuer

la GVHD, et, inversement, les anticorps anti-GARP bloquants abolissent cette protection. Les anticorps n'agissent pas en éliminant les Treg : le nombre de Treg humains n'est en effet pas diminué dans les souris traitées avec les anticorps anti-GARP bloquants. De plus, un anticorps présentant une mutation qui abolit sa capacité de se lier aux récepteurs Fc, conserve une activité totale. Nos résultats indiquent donc : (i) que la production de TGF- β 1 actif *via* GARP contribue à la fonction suppressive des Treg humains *in vivo* et (ii) que des anticorps anti-GARP peuvent inhiber cette immunosuppression *in vivo*, sans éliminer les Treg [6].

La notion que le TGF- β 1 contribue, ne serait-ce que partiellement, à l'immunosuppression exercée par les Treg, est loin d'être acceptée, notamment parce que les Treg de souris *Tgfb1*^{-/-} ne montrent pas d'anomalie de leur fonction suppressive *in vitro* [7]. Plusieurs études suggèrent néanmoins que le TGF- β 1 produit par les Treg supprime l'autoimmunité *in vivo* [8, 9]. Il est possible d'autre part que les Treg humains puissent supprimer les réponses immunes *via* des mécanismes qui seraient distincts de ceux utilisés par les Treg murins.

Quels avantages les anticorps anti-GARP pourraient-ils apporter à l'immunothérapie du cancer ?

D'une part, il convient de noter qu'aucun des anticorps immunostimulants actuellement disponibles en clinique,

n'agit en inhibant la fonction immunosuppressive des Treg. Les anticorps anti-CTLA-4 pourraient intervenir en partie en éliminant les Treg dans les tumeurs. Ce mode d'action a été démontré chez la souris [10], et pourrait aussi jouer un rôle chez les patients chez lesquels les anticorps anti-CTLA-4 provoquent des effets secondaires sévères de nature auto-immunitaire. Il est donc tentant de spéculer que l'administration d'anticorps anti-GARP, qui inhibent transitoirement la fonction des Treg sans les éliminer physiquement, serait moins toxique que l'administration d'anticorps anti-CTLA-4.

D'autre part, les anticorps anti-GARP ne devraient pas affecter la production de TGF- β 1 actif par les cellules autres que des Treg. Ceci pourrait être avantageux par rapport à une inhibition globale qui serait obtenue avec des anticorps anti-TGF- β 1, ou des inhibiteurs de l'activité kinase des récepteurs du TGF- β . Une telle inhibition de l'activité du TGF- β 1, qui est produit par tous les types cellulaires, pose le problème du risque d'effets secondaires sévères, comme la stimulation de la croissance de lésions pré-néoplasiques, puisque le TGF- β 1 exerce de puissants effets cyostatiques sur les cellules précancéreuses. Les anticorps anti-GARP devraient permettre une inhibition sélective de l'activité du TGF- β 1 dans les cellules immunitaires supprimées par les Treg. ♦

Immunosuppression by Treg can be decreased with anti-GARP antibodies

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012 ; 30 : 531-64.
2. Stockis J, Fink W, Francois V, et al. Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling. *Eur J Immunol* 2009 ; 39 : 869-82.
3. Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* 2014 ; 32 : 51-82.
4. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* 2009 ; 39 : 3315-22.

³ Autologue caractérise un tissu ou des cellules provenant de son propre organisme et autoadministré.

RÉFÉRENCES

- Tran DQ, Andersson J, Wang R, *et al.* GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 13445-50.
- Cuende J, Liénart S, Dedobbeleer O, *et al.* Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med* 2015 ; 7 : 284ra56.
- Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, *et al.* CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor β 1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 237-46.
- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* 2006 ; 25 : 441-54.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007 ; 26 : 579-91.
- Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 2013 ; 210 : 1695-710.
- Siri A, de Boysson H, Boursier G. Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4⁺. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 646-51.

NOUVELLE

Trafic cellulaire des récepteurs GABA_B vers la membrane : PRAF2, un nouveau point de contrôle

Stéphane Doly, Stefano Marullo

Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, université Paris Descartes, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

stefano.marullo@inserm.fr

► Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), dont on compte plusieurs centaines de membres, représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires¹ [17]. Ils sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques et représentent actuellement environ 30 % des cibles thérapeutiques médicamenteuses.

Les signaux résultant de l'activation des RCPG, et par conséquent leurs effets physiologiques, dépendent de leur densité à la surface cellulaire et de leur adressage dans des régions spécifiques de la membrane plasmique telles que les synapses pour les cellules neuronales. La plupart des données actuelles sur le trafic cellulaire des RCPG concernent leur internalisation (par endocytose) après qu'ils aient été activés par leurs ligands agonistes, leur recyclage ou leur orientation vers la voie de dégradation lysosomiale. En revanche, les mécanismes qui régulent l'export de ces récepteurs des compartiments de biosynthèse vers la surface cellulaire, sont beaucoup moins bien connus. En effet, il est généralement admis que les RCPG nouvellement synthétisés sont localisés dans des vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique sans contrôle

particulier (voie de sécrétion non régulée). Cependant, de nombreuses observations indiquent que le trafic de ces récepteurs vers la surface cellulaire pourrait être régulé par des interactions avec certaines protéines et par des signaux extra-cellulaires. Des études récentes démontrent que pour de nombreux RCPG, une proportion importante des récepteurs est retenue dans des compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE) ou l'appareil de Golgi [1]. Ces « réserves » peuvent être mobilisables vers la membrane plasmique en réponse à une stimulation physiologique qui nécessite une augmentation rapide de la réceptivité cellulaire [2, 3]. De plus, dans des expériences d'expression des RCPG dans des cellules modèles ne les exprimant pas naturellement (expression hétérologue), il a été montré que beaucoup d'entre eux nécessitent une association à des protéines d'escorte ou à des chaperons moléculaires pour être correctement exprimés à la surface. Les récepteurs olfactifs en sont un des exemples les plus connus et cette caractéristique a pendant longtemps empêché leur étude fonctionnelle *in vitro* [1]. Dans plusieurs pathologies humaines, comme le diabète insipide néphrogénique, la rétinite pigmentaire, l'obésité ou l'hypogonadisme, des mutations somatiques des RCPG [4] ou

de protéines nécessaires à leur maturation [5], sont à l'origine d'un excès de rétention dans les compartiments intracellulaires. Ce défaut s'accompagne d'une altération de la réceptivité à la surface des cellules qui est directement responsable des effets pathologiques observés. Ces récepteurs séquestrés sont cependant potentiellement fonctionnels. Leur capacité de signalisation peut en effet être récupérée sous l'action de chaperons pharmacologiques, capables de franchir les membranes cellulaires et de se lier à eux pour favoriser leur adressage en surface [6, 7].

Un des RCPG les plus étudiés comme modèle de rétention intracellulaire est la sous-unité GB1 du récepteur métabotropique GABA_B. Le GABA (acide gamma-amino butyrique) est le principal neuromédiateur inhibiteur du cerveau. Il contrôle de nombreuses fonctions sensorimotrices et cognitives. Les récepteurs GABA_B sont des hétérodimères obligatoires composés de deux sous unités GB1 et GB2. Dans l'hétérodimère, GB1 lie le GABA, tandis que GB2 est responsable de l'activation de la protéine G ; en absence de formation de l'hétérodimère, il ne peut donc pas avoir de récepteurs GABA_B fonctionnels. La sous-unité GB1, exprimée seule, est retenue de manière constitutive dans le réticulum endoplasmique. Elle n'est libérée puis adres-

¹ Voir le numéro thématique consacré à ces récepteurs RCPG, *m/s* n° 10, vol. 28, octobre 2012.