



# IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE PAR TRANSFERT DE L'ARN MESSAGER DE L'ANTIGÈNE MELANA/MART-1

Mockey Mickaël

## ► To cite this version:

Mockey Mickaël. IMMUNOTHÉRAPIE ANTITUMORALE PAR TRANSFERT DE L'ARN MESSAGER DE L'ANTIGÈNE MELANA/MART-1. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Orléans, 2006. Français. <NNT : >. <tel-00158049>

**HAL Id: tel-00158049**

**<https://theses.hal.science/tel-00158049v1>**

Submitted on 27 Jun 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



UNIVERSITE D'ORLEANS

**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

**Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire**

PAR

**Michaël MOCKEY**

**Immunothérapie antitumorale  
par transfert de l'ARN messenger de l'antigène MelanA/MART-1**

**Directeur de thèse : Dr. Patrick MIDOUX**

**Soutenue le : 24 Novembre 2006**

**MEMBRES DU JURY:**

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| - Pr. François ERARD     | Président du jury, Pr, Université d'Orléans, France.      |
| - Pr. Pascale JEANNIN    | Rapporteur, Pr, Faculté de médecine d'Angers, France.     |
| - Pr. Daniel SCHERMAN    | Rapporteur, Pr, Faculté de pharmacie Paris 5, France.     |
| - Dr. Kenneth McCULLOUGH | Examineur, Dr, IVI, Mittelhäusern, Suisse.                |
| - Pr. Chantal PICHON     | Co-directrice de thèse, Pr, Université d'Orléans, France. |
| - Dr. Patrick MIDOUX     | Directeur de thèse, DR-INSERM, CNRS Orléans, France.      |

# REMERCIEMENTS

Je remercie

Le Docteur Patrick MIDOUX de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche « Transfert de gènes par des vecteurs synthétiques », de la confiance qu'il m'a accordée, de m'avoir permis de mener ce travail à bien et prodigué ses conseils avisés.

Le Professeur Chantal PICHON pour son aide tant technique que théorique en biologie cellulaire et en immunologie.

Les Professeurs Pascal JEANNIN (*INSERM U564, Angers*) et Daniel SCHERMANN (*U640/UMR8151, Paris*) d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. De l'intérêt qu'ils ont montré pour mon travail et de leur expertise.

Le Docteur Kenneth McCULLOUGH (*IVI, Mittelhäusern, Suisse*) d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et émis un rapport détaillé malgré son absence à ma soutenance ; ainsi que le Professeur François ERARD (*IEM, UMR 6218, Orléans*) pour son analyse, ses conseils, son soutien, sa disponibilité et nos longues discussions...

Tous les membres de l'équipe qui ont collaboré à ces travaux et tout particulièrement, Erika BOURSEAU, pour son engagement et son amitié, Cristine GONCALVES, pour sa bonne humeur et son efficacité.

Toutes les personnes du projet « Complexes multifonctionnels et reconnaissance cellulaire : thérapie génique et vaccinologie » de leur attention à mon égard, de leur écoute et de leur collaboration. Plus particulièrement Véronique et Friedrich PILLER ainsi que Nicole BUREAUD pour leurs conseils techniques et leur générosité. David GOSSET pour son aide précieuse en cytométrie en flux et Isidore DECOSTAIRE pour sa vitalité.

Le personnel de l'IEM (*UMR CNRS 6218, Orléans*) et notamment les Docteurs Valérie QUESNIAUX et Bernard RYFFEL pour m'avoir accueilli dans leurs locaux, pour leurs conseils en immunologie, leur gentillesse et leur disponibilité. Isabelle MERCIER-MAILLET pour mon initiation à l'expérimentation animale, sa patience, son entrain. David TORRES et Laure JANOT pour les longues heures passées à mes côtés lors des vaccinations.

Les collaborateurs maîtrisant l'art de la différenciation des cellules dendritiques humaines, notamment Denis MICHEL (*UMR CNRS 6026, Rennes I*), Marc GREGOIRE (*INSERM U601, Nantes*), Pascale JEANNIN (*INSERM U564, Angers*) et François LEMOINE (*UMR CNRS 7087, Paris*) sans qui toute une partie de ce travail n'aurait pas été possible.

Le Docteur Chauhuri ARABINDA (*IICT, Hyderabad, Inde*) de m'avoir fourni les vecteurs lipidiques.

Le Docteur Eric LE CAM (*IGR, UMR CNRS 8126, Villejuif*) pour son expertise en microscopie électronique et les images qu'il nous a permis d'obtenir.

Mes amis Eric, Vanessa, Sonia, Erika, William, Fabien, Samia, Edouard, Patrick, Simon et toute l'équipe de l'ADOC pour avoir partagé ces trois années passées au CBM. Mais également Julien, Fabrice, Emilie qui malgré la distance ont été présents pour me soutenir.

Ma belle-famille pour sa présence et son enthousiasme.

Ma famille et plus particulièrement mes tantes Corinne et Jocelyne pour leur courage et leur aide sans faille. Mon père Edouard et mes soeurs Sarah et Tania pour leurs encouragements. Mais surtout ma mère Dominique et mon beau-père Jean-Paul, ainsi que mes grand-parents Noëlle et André, d'avoir toujours été là pour moi et ce malgré les difficultés...merci.

Sarah de m'avoir supporté, écouté, compris, conseillé. D'avoir partagé les pires comme les meilleurs moments de ces trois années. Merci d'avoir été là et d'avoir été toi ... tout simplement.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	1
SOMMAIRE.....	2
TABLE DES MATIÈRES.....	5
ABRÉVIATIONS .....	8
INTRODUCTION .....	11
GÉNÉRALITÉS .....	15
CHAPITRE I : MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE LA RÉPONSE IMMUNE ET VACCINATION. ....	16
I. LES VOIES DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE. ....	16
I-A. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. ....	17
1. Voie endogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I. ....	19
2. Voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe II.....	20
3. « Présentation croisée » ou voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I. ....	21
I-B. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes T.....	23
I-C. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes B. ....	25
II. LES RÉPONSES IMMUNITAIRES DE TYPE TH1 ET TH2. ....	28
II-A. La réponse de type Th1. ....	28
II-B. La réponse de type Th2. ....	29
III. LES AUTRES CELLULES EFFECTRICES DE LA RÉPONSE ANTIGÉNIQUE. ....	29
III-A. Les cellules NK et NKT. ....	29
III-B. Les lymphocytes T régulateurs.....	30
IV. LA VACCINATION.....	31
CHAPITRE II : LES CELLULES DENDRITIQUES. ....	33
I. DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISATION DES DCs. ....	33
II. LES DCs MURINES.....	36
III. LES DCs HUMAINES. ....	38
IV. LA GÉNÉRATION DE DCs EN VUE D'APPLICATIONS CLINIQUES.....	41
CHAPITRE III : LES ANTIGÈNES TUMORAUX. ....	44
I. LES ANTIGÈNES CODÉS PAR DES GÈNES MUTÉS OU ANORMALEMENT EXPRIMÉS.....	44
I-A. Les antigènes « uniques » codé par des gènes mutés.....	44
I-B. Les antigènes non mutés surexprimés.....	45
II. LES ANTIGÈNES TUMEUR-SPÉCIFIQUES. ....	45
III. LES ANTIGÈNES DE DIFFÉRENCIATION. ....	46
CHAPITRE IV : IMMUNOTHÉRAPIE CELLULAIRE ET VACCINATION GÉNIQUE	
ANTI-CANCÉREUSE.....	48
I. THÉRAPIE CELLULAIRE.....	48
I-A. Chargement exogène.....	48
1. Les corps apoptotiques.....	48
2. Les exosomes.....	48
3. Les protéines antigéniques.....	49
4. Les peptides antigéniques.....	49
I-B. Chargement endogène.....	53
1. Vecteurs viraux.....	53

2. Méthodes physiques.....	55
3. Méthodes chimiques.....	57
II. VACCINATION GÉNIQUE.....	66
II-A. Injection des A.N. nus.....	66
II-B. Méthodes physiques.....	67
1. Electroporation.....	67
2. Bombardement de gènes ou « gene gun ».....	67
II-C. Méthodes chimiques.....	68
CHAPITRE V : L'ARN MESSAGER, CIBLE THÉRAPEUTIQUE ET PRINCIPE ACTIF.....	71
I. SYNTHÈSE, MATURATION ET RÉGULATION DE L'ARN MESSAGER.....	72
I-A. Synthèse de l'ARN messager ou processus de transcription.....	72
1. La transcription chez les eucaryotes.....	72
2. La transcription in-vitro.....	73
I-B. Maturation de l'ARNm.....	74
1. Modification en 5' : ajout de la coiffe ou « capping ».....	74
2. Modification en 3' : la polyadénylation.....	74
3. Le processus d'épissage.....	74
I-C. Régulations de l'ARNm.....	76
II. L'ARNm EN THÉRAPIE : DE LA CIBLE AU PRINCIPE ACTIF.....	77
II-A. Inhibition de l'expression génique.....	77
II-B. Correction de l'expression génique.....	78
II-C. Immunostimulation.....	78
CHAPITRE VI : LES VECTEURS HISTIDYLÉS.....	81
I. POLYMÈRES ET PEPTIDES CATIONIQUES RICHES EN HISTIDINE.....	81
II. LIPIDES CATIONIQUES RICHES EN HISTIDINE.....	86
RÉSULTATS.....	88
1 <sup>ÈRE</sup> PARTIE: TRANSFERT DE L'ARNm D'UN ANTIGÈNE TUMORAL DANS LES CELLULES	
DENDRITIQUES.....	89
RÉSUMÉ.....	89
MODIFICATIONS DES EXTRÉMITÉS 5' ET 3' NON CODANTES DE L'ARNm ET LEUR EFFET SUR	
L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE APRÈS TRANSFECTION.....	92
TRANSFECTION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES PAR DES COMPLEXES	
ARNm/VECTEUR HISTIDYLÉS.....	100
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	102
RÉSULTATS.....	106
Influence des conditions de cultures sur la viabilité des DCs humaines.....	106
Transfection des hDCs avec l'ARNm complexé avec les vecteurs histidylés.....	108
Internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm dans les hDCs.....	111
DISCUSSION.....	113
RÉFÉRENCES.....	115
2 <sup>ÈME</sup> PARTIE: VACCINATION ANTI-CANCÉREUSE PAR INJECTION DIRECTE DE L'ARNm D'UN	
ANTIGÈNE TUMORAL.....	116
RÉSUMÉ.....	116

<b>LES LIPOPOLYPLEXES DE POLYLYSINE PEGYLÉE RICHE EN HISTIDINE/ L-HISTIDINE-(N,N-DI-N-HEXADÉCYLAMINE)ÉTHYLAMIDE/ARNm COMME VECTEUR EFFICACE POUR UNE DÉLIVRANCE <i>IN VIVO</i> D'UN ANTIGÈNE TUMORAL. ....</b>	<b>118</b>
ABSTRACT .....	120
INTRODUCTION .....	121
EXPERIMENTAL SECTION.....	123
RESULTS.....	127
PEGylated Histidine-rich polylysine (PEG-HpK).....	127
Synthesis of L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide (HDHE). ....	128
Characterization of MART1 mRNA complexes. ....	128
Immunization with MART1 mRNA lipopolyplexes prevents tumour growth.....	131
DISCUSSION .....	133
CONCLUSION.....	135
REFERENCES .....	137
<b>VACCIN ANTITUMORAL PAR TRANSFERT D'ARNm: PROTECTION CONTRE LA PROGRESSION ET LES MÉTASTASES DU MÉLANOME B16 PAR VACCINATION À L'AIDE DE LIPOPOLYPLEXES HISTIDYLÉS D'ARNm MART1. ....</b>	<b>139</b>
ABSTRACT .....	141
INTRODUCTION .....	142
MATERIALS AND METHODS .....	144
RESULTS.....	148
MART1 mRNA lipopolyplexes induce protection against B16 melanoma. ....	148
Influence of mRNA Poly(A) tail length on tumour protective effect. ....	150
Effectiveness of mRNA versus DNA vaccine .....	151
Optimisation of MART1 mRNA dose administration.....	152
MART1 mRNA lipopolyplexes do not induce antibody response.....	152
MART1 mRNA lipopolyplexes induce a cellular immune response. ....	153
Synergic effect of MHC class I and class II presentation pathways in the melanoma immune response.....	155
DISCUSSION .....	157
REFERENCES .....	161
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>164</b>
I. STRATÉGIE <i>EX VIVO</i> .....	165
II. STRATÉGIE <i>IN VIVO</i> .....	166
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>190</b>

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	1
SOMMAIRE.....	2
TABLE DES MATIÈRES.....	5
ABRÉVIATIONS .....	8
INTRODUCTION .....	11
GÉNÉRALITÉS .....	15
CHAPITRE I : MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE LA RÉPONSE IMMUNE ET VACCINATION. ....	16
I. LES VOIES DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE. ....	16
I-A. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. ....	17
1. Voie endogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I. ....	19
2. Voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe II.....	20
3. « Présentation croisée » ou voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I. ....	21
I-B. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes T.....	23
I-C. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes B. ....	25
II. LES RÉPONSES IMMUNITAIRES DE TYPE TH1 ET TH2. ....	28
II-A. La réponse de type Th1. ....	28
II-B. La réponse de type Th2. ....	29
III. LES AUTRES CELLULES EFFECTRICES DE LA RÉPONSE ANTIGÉNIQUE. ....	29
III-A. Les cellules NK et NKT. ....	29
III-B. Les lymphocytes T régulateurs.....	30
IV. LA VACCINATION.....	31
CHAPITRE II : LES CELLULES DENDRITIQUES. ....	33
I. DÉCOUVERTE ET CARACTÉRISATION DES DCs. ....	33
II. LES DCs MURINES.....	36
III. LES DCs HUMAINES. ....	38
IV. LA GÉNÉRATION DE DCs EN VUE D'APPLICATIONS CLINIQUES.....	41
CHAPITRE III : LES ANTIGÈNES TUMORAUX. ....	44
I. LES ANTIGÈNES CODÉS PAR DES GÈNES MUTÉS OU ANORMALEMENT EXPRIMÉS.....	44
I-A. Les antigènes « uniques » codé par des gènes mutés.....	44
I-B. Les antigènes non mutés surexprimés.....	45
II. LES ANTIGÈNES TUMEUR-SPÉCIFIQUES. ....	45
III. LES ANTIGÈNES DE DIFFÉRENCIATION. ....	46
CHAPITRE IV : IMMUNOTHÉRAPIE CELLULAIRE ET VACCINATION GÉNIQUE ANTI-CANCÉREUSE. ....	48
I. THÉRAPIE CELLULAIRE.....	48
I-A. Chargement exogène.....	48
1. Les corps apoptotiques.....	48
2. Les exosomes.....	48
3. Les protéines antigéniques.....	49
4. Les peptides antigéniques.....	49
I-B. Chargement endogène.....	53
1. Vecteurs viraux.....	53

2. Méthodes physiques.....	55
3. Méthodes chimiques.....	57
II. VACCINATION GÉNIQUE.....	66
II-A. Injection des A.N. nus.....	66
II-B. Méthodes physiques.....	67
1. Electroporation.....	67
2. Bombardement de gènes ou « gene gun ».....	67
II-C. Méthodes chimiques.....	68
CHAPITRE V : L'ARN MESSAGER, CIBLE THÉRAPEUTIQUE ET PRINCIPE ACTIF.....	71
I. SYNTHÈSE, MATURATION ET RÉGULATION DE L'ARN MESSAGER.....	72
I-A. Synthèse de l'ARN messager ou processus de transcription.....	72
1. La transcription chez les eucaryotes.....	72
2. La transcription in-vitro.....	73
I-B. Maturation de l'ARNm.....	74
1. Modification en 5' : ajout de la coiffe ou « capping ».....	74
2. Modification en 3' : la polyadénylation.....	74
3. Le processus d'épissage.....	74
I-C. Régulations de l'ARNm.....	76
II. L'ARNm EN THÉRAPIE : DE LA CIBLE AU PRINCIPE ACTIF.....	77
II-A. Inhibition de l'expression génique.....	77
II-B. Correction de l'expression génique.....	78
II-C. Immunostimulation.....	78
CHAPITRE VI : LES VECTEURS HISTIDYLÉS.....	81
I. POLYMÈRES ET PEPTIDES CATIONIQUES RICHES EN HISTIDINE.....	81
II. LIPIDES CATIONIQUES RICHES EN HISTIDINE.....	86
RÉSULTATS.....	88
1 <sup>ÈRE</sup> PARTIE: TRANSFERT DE L'ARNM D'UN ANTIGÈNE TUMORAL DANS LES CELLULES	
DENDRITIQUES.....	89
RÉSUMÉ.....	89
MODIFICATIONS DES EXTRÉMITÉS 5' ET 3' NON CODANTES DE L'ARNm ET LEUR EFFET SUR	
L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE APRÈS TRANSFECTION.....	92
TRANSFECTION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES PAR DES COMPLEXES	
ARNm/VECTEUR HISTIDYLÉS.....	100
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	102
RÉSULTATS.....	106
Influence des conditions de cultures sur la viabilité des DCs humaines.....	106
Transfection des hDCs avec l'ARNm complexé avec les vecteurs histidylés.....	108
Internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm dans les hDCs.....	111
DISCUSSION.....	113
RÉFÉRENCES.....	115
2 <sup>ÈME</sup> PARTIE: VACCINATION ANTI-CANCÉREUSE PAR INJECTION DIRECTE DE L'ARNm D'UN	
ANTIGÈNE TUMORAL.....	116
RÉSUMÉ.....	116



<b>LES LIPOPOLYPLEXES DE POLYLYSINE PEGYLÉE RICHE EN HISTIDINE/ L-HISTIDINE-(N,N-DI-N-HEXADÉCYLAMINE)ÉTHYLAMIDE/ARNm COMME VECTEUR EFFICACE POUR UNE DÉLIVRANCE <i>IN VIVO</i> D'UN ANTIGÈNE TUMORAL. ....</b>	<b>118</b>
ABSTRACT .....	120
INTRODUCTION .....	121
EXPERIMENTAL SECTION.....	123
RESULTS.....	127
PEGylated Histidine-rich polylysine (PEG-HpK).....	127
Synthesis of L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide (HDHE). ....	128
Characterization of MART1 mRNA complexes. ....	128
Immunization with MART1 mRNA lipopolyplexes prevents tumour growth.....	131
DISCUSSION .....	133
CONCLUSION.....	135
REFERENCES .....	137
<b>VACCIN ANTITUMORAL PAR TRANSFERT D'ARNm: PROTECTION CONTRE LA PROGRESSION ET LES MÉTASTASES DU MÉLANOME B16 PAR VACCINATION À L'AIDE DE LIPOPOLYPLEXES HISTIDYLÉS D'ARNm MART1. ....</b>	<b>139</b>
ABSTRACT .....	141
INTRODUCTION .....	142
MATERIALS AND METHODS .....	144
RESULTS.....	148
MART1 mRNA lipopolyplexes induce protection against B16 melanoma. ....	148
Influence of mRNA Poly(A) tail length on tumour protective effect. ....	150
Effectiveness of mRNA versus DNA vaccine .....	151
Optimisation of MART1 mRNA dose administration.....	152
MART1 mRNA lipopolyplexes do not induce antibody response.....	152
MART1 mRNA lipopolyplexes induce a cellular immune response. ....	153
Synergic effect of MHC class I and class II presentation pathways in the melanoma immune response.....	155
DISCUSSION .....	157
REFERENCES .....	161
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>164</b>
I. STRATÉGIE <i>EX VIVO</i> .....	165
II. STRATÉGIE <i>IN VIVO</i> .....	166
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>190</b>

# ABRÉVIATIONS

**A.N** : acides nucléiques.  
**AAV** : virus associé à l'adénovirus.  
**ADN** : acide désoxyribonucléique.  
**ADNc** : ADN complémentaire.  
**ADNp** : acide désoxyribonucléique plasmidique.  
**AdV** : adénovirus.  
**Ag** : antigène.  
**AG** : appareil de Golgi  
**APC** : cellules présentatrice d'antigènes.  
**ARN (m)** : acide ribonucléique (messenger).  
**ATP** : adénosine triphosphate.  
**AUBP** : protéines se liant aux AURE.  
**AURE** : séquences ARN riche en A et U.  
**BAGE** : antigène B du mélanome.  
**BCL** : protéine anti-apoptotique (« B-cell lymphoma protein »).  
**BCR** : récepteur des lymphocytes B.  
**BMDC** : cellules d'origine médullaire.  
**Caf** : facteur associé à Ccr.  
**CASP-8** : caspase 8.  
**Ccr** : répresseur de catabolisme du carbone.  
**CD** : marqueur de différenciation (« Cluster of différenciation »).  
**CDK4** : cycline D kinase 4.  
**CEA** : antigène carcinoembryogénique.  
**Cho** : cholestérol.  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité.  
**CMV** : cytomégalovirus.  
**CSFV** : virus de la fièvre porcine.  
**CTL** : lymphocytes T cytotoxique.  
**DAG** : diacylglycérol.  
**DC** : cellule dendritique.  
**DEXs** : exosomes dérivés de DCs.  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde.  
**dp** : degré de polymérisation.  
**EBV** : virus d'Epstein Barr.  
**EDTA** : éthylène diamine tétraacétate de sodium.  
**eIF** : facteur d'initiation de la traduction.  
**FBS** : sérum de veau foetal.  
**FGF** : facteur de croissance fibroblastique.  
**FITC** : isothiocyanate de fluorescéine.  
**FLT3-L** : ligand de la fms-like tyrosine kinase 3.  
**GAGE** : antigène G du mélanome.  
**GM-CSF** : facteur de croissance des granulocytes-macrophages.  
**gp100**: glycoprotéine de 100 kDa.  
**GPI** : glycoposphatidylinositol.  
**GTP**: guanosine triphosphate.  
**HDHE** : L-histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide.  
**HER-2/neu** : récepteur oncogène à l'EGF  
**His** : histidine.  
**HLA** : antigènes des leucocytes Humain (« Human Leucocyte Antigens »).  
**HoK** : oligolysine histidylée.  
**HpK** : polylysine histidylée.  
**HPV** : papilloma virus humain.

**HSV** : virus *Herpes simplex*.  
**hTERT** : sous-unité catalytique de la télomérase.  
**i.d.** : intradermique.  
**i.m.** : intramusculaire.  
**i.n.** : intranodulaire.  
**i.p.** : intrapéritonéale.  
**i.v.** : intraveineuse.  
**IFN** : interféron .  
**IKK** : kinases spécifiques de la protéine IκB.  
**IL** : interleukine.  
**IP3** : inositol 1,4,5 triphosphate.  
**IVT** : transcrit in vitro.  
**KLH** : adjuvant Keyhole Limpet Hemocyanine.  
**LC** : cellule de Langerhans.  
**Lipo** : lipides cationiques.  
**LPD** : complexe lipide-protamine-ADN.  
**LPS** : lipopolysaccharides.  
**LV** : lentivirus.  
**MAGE** : "*melanoma-associated antigen*", antigène associé au mélanome.  
**MAPK** : MAP kinase.  
**MART1/MelanA**: "*melanoma antigen recognized by T cells / melanoma antigen A*", antigène A du mélanome.  
**MEM** : milieu minimum essentiel d'Eagle.  
**Mo-DCs** : DC dérivées des PBMC.  
**MOI** : taux de particules virales par cellule.  
**MUC1** : mucine 1.  
**MyD88** : protéine adaptatrice des TLRs dans la voie NFκ-B.  
**NK** : cellules « Natural Killer ».  
**NLS** : signal de localisation nucléaire.  
**ODN** : oligodésoxynucléotides.  
**OptiMEM** : milieu optimisé pour les transfections.  
**ORF** : cadre ouvert de lecture.  
**Pab** : protéine se liant à la queue poly(A) (levure).  
**PABP** : protéine se liant à la queue poly(A) (eucaryotes supérieurs).  
**Pan** : ribonucléase poly(A)-spécifique PAB-dépendante.  
**PARN** : poly(A) ribonucléase.  
**PBMC** : cellules mononucléées du sang périphérique.  
**PBS** : tampon phosphate salin pH = 7,4.  
**pDC** : cellule dendritique plasmacytoïde.  
**PEG** : polyéthylène glycol.  
**PEI** : polyéthylèneimine.  
**PEI-HIS** : polyéthylèneimine histidylée.  
**PET** : PBS avec 0,02% d'EDTA et 2,5 µg/ml de trypsine.  
**PFA** : paraformaldéhyde.  
**PGE2**: prostaglandine E2  
**PI3K** : phospho-inositol-3 kinase.  
**PIP2**: phosphoinositol 2 phosphate.  
**pK**: polylysine.  
**PKA** : protéine kinase A.  
**PKC** : protéine kinase C.  
**PLC** : phospholipase C.  
**pLK** : poly-L-lysine.  
**pLK-His** : poly-L-lysine histidylée.  
**PSA** : antigène membranaire spécifique de la prostate.  
**PTM** : ARN de pré-trans-épissage.

**RE** : réticulum endoplasmique.  
**RHAMM** : récepteur pour l'acide hyaluronique.  
**RLU** : unité de lumière relative.  
**s.c** : sous-cutané.  
**SCF** : facteur de croissance des précurseurs hématopoeïtiques.  
**SAB** : sérum albumine bovine.  
**SmaRT** : épissage en trans médié par le spliceosome.  
**SV40** : virus *simien 40*.  
**SVF** : sérum de veau fœtal.  
**TAA** : antigène associé aux tumeurs.  
**TAP** : transporteur associé à la présentation antigénique.  
**TCR** : récepteur des lymphocytes T.  
**TEXs** : exosomes dérivés de cellules tumorales.  
**TF** : facteur de transcription.  
**TGF- $\beta$**  : facteur de croissance transformant  $\beta$ .  
**Th** : lymphocytes T auxiliaire (" helper ").  
**TIL** : lymphocytes T infiltrés.  
**TLR** : recepteur Toll-like.  
**TNF** : facteur de nécrose des tumeurs.  
**TRP** : enzyme du mélanosome (DOPA chrome tautomérase, "*tyrosinase-related protein*").  
**UTR** : région non transcrite.  
**VIH** : virus d'immunodéficience humaine.  
**VIS** : virus d'immunodéficience simienne.  
**VV** : virus de la vaccine.  
**XIAP** : inhibiteur de caspase ("X-linked mammalian inhibitor of apoptosis").

## INTRODUCTION

La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention des maladies qui utilise les acides nucléiques comme médicaments. Elle consiste, en particulier, au transfert d'une information génétique dans certaines cellules du patient afin de corriger un gène endogène déficient, de moduler l'expression de gènes endogènes connus ou d'éradiquer des cellules cancéreuses. C'est dans ce dernier domaine d'application que se mobilise la majorité des essais cliniques actuels (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). La thérapie génique trouve une place toute particulière en cancérologie tant au niveau des enjeux de santé publique qu'au niveau de la diversité des techniques de traitements possibles. En effet, l'émergence de la génomique et de la protéomique a permis une meilleure compréhension des mécanismes de prolifération et d'invasion des cellules tumorales. Ces approches ont conduit à l'identification de certains acteurs des processus tumoraux, mais également à la détermination de marqueurs spécifiques, laissant ainsi entrevoir les cibles thérapeutiques des médicaments anti-cancéreux de demain. De ces nouvelles connaissances, deux stratégies sont actuellement développées. La première consiste au transfert dans les cellules cancéreuses de gènes spécifiques (gènes suppresseurs de tumeur, gènes suicides) agissant directement sur ces cellules. L'expression de tels transgènes conduit à la restauration d'un phénotype normal des cellules ou à leur mort. La seconde stratégie vise à stimuler le système immunitaire du patient pour éradiquer la tumeur. En effet, les progrès récents en immunologie cellulaire et moléculaire ont mis en évidence le rôle crucial dans le contrôle de la croissance tumorale de certains types de cellules immunes. L'ensemble de ces découvertes a alors ouvert un nouveau champ d'investigation pour la thérapie génique qui se confond désormais avec la thérapie cellulaire. L'objectif est de modifier ces cellules clefs en vue d'éduquer le système immunitaire pour une reconnaissance des cellules cancéreuses et le déclenchement d'une réponse immune adaptée.

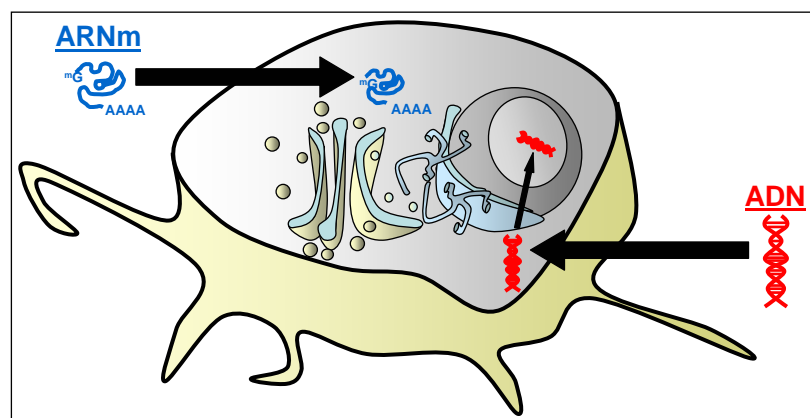
Dans les mécanismes complexes de la réponse antitumorale, on peut distinguer les cellules qui sont initiatrices et celles qui sont effectrices de la réponse immune. Parmi ces effecteurs, les lymphocytes B qui sont acteurs de la réponse humorale conduisant à la sécrétion d'anticorps, mais surtout les lymphocytes T auxiliaires (Th) et cytotoxiques (CTL) qui sont responsables de la réponse cellulaire semblent avoir un rôle prépondérant. En effet, en présentant des peptides antigéniques à leur surface, les cellules tumorales peuvent être perçues comme étrangères ("non-soi") par le système immunitaire. Ces peptides sont générés dans le cytoplasme par l'action protéolytique d'un complexe multimérique, le protéasome. Ils sont transférés du cytoplasme au réticulum endoplasmique où ils s'associent

aux molécules natives du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). L'ensemble est ensuite transporté à la surface de la cellule. Ces peptides antigéniques ainsi apprêtés sont reconnus et les cellules tumorales lysées par les CTLs, après liaison du complexe CMH-I/peptide au récepteur T (TCR) des CTLs. Cependant ces lymphocytes naïfs, générées dans le thymus, doivent être activés afin d'acquérir ces propriétés effectrices. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APCs) et plus particulièrement les cellules dendritiques (DCs), présentant le complexe CMH-I/peptide approprié sont capables d'activer de tels CTLs, et ainsi d'induire la lyse de toute cellule somatique présentant un complexe CMH-I/peptide identique. Un autre acteur, le lymphocyte Th, est nécessaire à une réponse anti-tumorale adaptée. En effet, l'expansion clonale des CTLs et le maintien de la réponse à médiation cellulaire nécessitent l'activation et la coopération des lymphocytes CD4<sup>+</sup> auxiliaires, avec notamment la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2). Cette activation des Th se fait également par les APCs, seules cellules à exprimer les molécules CMH de classe II indispensables à la présentation des peptides antigéniques au TCR des lymphocytes CD4<sup>+</sup>.

A partir de ces connaissances, deux types d'approches peuvent être entreprises dans le cadre de l'immunothérapie antitumorale. L'immunothérapie « passive » ou « adoptive » est basée sur le transfert de lymphocytes T fonctionnels, spécifiques de la tumeur et cultivés *ex vivo* en milieu adéquat. Cette première technique développée dès 1985 par le groupe de Steven Rosenberg, consiste en une isolation, une amplification et une réinjection de lymphocytes T infiltrés (TILs) isolés des tumeurs de patient ou de clones T spécifiques d'antigène. Une autre approche prometteuse est la vaccination ou immunothérapie « active », qui consiste à introduire un ou plusieurs antigènes tumoraux sous une forme immunogène. L'objectif étant cette fois-ci de stimuler une réponse immunitaire T *in vivo*. Les efforts de recherche se focalisent en particulier sur le « chargement » des cellules dendritiques (DCs) avec des antigènes. Les DCs sont des cellules initiatrices et non effectrices de la réponse immune agissant comme des « chefs d'orchestre ». Classiquement, on peut distinguer deux stratégies. La première, dite stratégie *in vivo*, consiste en une injection directe du ou des antigène(s) immunogène(s) chez le patient. La seconde, dite stratégie *ex vivo*, consiste au prélèvement de cellules précurseurs, à leur différenciation en DCs, à leur chargement avec les antigènes, à leur maturation et à leur réinjection chez le patient. La réponse immunitaire T n'est ici aussi stimulée qu'*in vivo*. Dans cette approche d'immunothérapie active, les antigènes immunisants utilisés se déclinent sous diverses formes telles que des cellules tumorales entières ou fractionnées (lysats, corps apoptotiques, exosomes), des protéines immunogènes entières, des peptides immunogènes ou enfin des acides nucléiques (A.N.) codant pour ces protéines.

C'est dans cette dernière application que la thérapie génique rejoint la thérapie cellulaire. Cependant, peu de solutions existent à l'heure actuelle pour transférer

efficacement et en toute sécurité des gènes dans les DCs du patient. L'introduction de l'information génétique conduisant à une expression correcte de l'antigène dans les DCs nécessite l'emploi de vecteurs. Ceux-ci peuvent être d'origine virale ou synthétique. Les vecteurs viraux sont de différentes natures. Des virus ont été modifiés pour introduire un transgène dans leur génome et atténués afin de transférer avec le plus de sécurité possible le matériel génétique souhaité dans les cellules du patient. Dans une approche non virale, des techniques physiques ont été développées mais leur application est soit restreinte à une transfection *in vitro* (cas de l'électroporation), soit d'une efficacité limitée *in vivo* (cas du bombardement de gènes). Des vecteurs chimiques, tels que des polymères cationiques ou des lipides cationiques, ont été parallèlement activement développés. L'efficacité du transfert de gène dépend alors de la capacité du complexe A.N./vecteur à franchir plusieurs barrières intra et extracellulaires. Lors d'une administration systémique (en intra veineuse), le complexe doit faire face aux composants du sang, traverser la paroi des vaisseaux pour entrer dans les organes et atteindre les cellules cibles. Ensuite, viennent les étapes intracellulaires telles que l'internalisation des A.N. dans la cellule, le passage et la diffusion dans le cytosol, l'importation dans le noyau cellulaire et l'accessibilité à la machinerie nucléaire pour l'expression du gène (Figure 1). Cependant, le passage de l'enveloppe nucléaire dans le cas de cellules quiescentes ne pouvant se faire efficacement que lors de l'entrée en mitose, le transfert d'ADN plasmidique trouve actuellement ses limites. Au contraire, le processus de transcription ayant lieu dans le cytosol, l'expression d'un transgène à partir de son ARN messenger (ARNm) n'est pas affectée par cette dernière étape. L'utilisation de l'ARNm présente donc un avantage considérable par rapport celle de l'ADN plasmique pour la transfection de cellules différenciées ne se divisant plus ou peu telles que les cellules dendritiques. C'est cette dernière approche que j'ai choisi de développer pour l'introduction d'antigènes tumoraux dans des DCs utilisables en immunothérapie anti-cancéreuse et pour la génération d'un vaccin antitumoral.



**Figure 1 : Représentation du transfert de l'ADN plasmidique ou de l'ARNm dans les DCs.**

Au laboratoire des polymères et des lipides cationiques présentant des radicaux histidyles sont développés. Les polymères cationiques sont à base de polylysine et forment des complexes électrostatiques avec des A.N. chargés négativement qui sont appelés polyplexes. Ceci permet une compaction, facilitant la résistance des A.N. vis-à-vis des nucléases et leur pénétration dans les cellules. Ces complexes A.N./polymère cationique. Des lipides cationiques histidylés ont eux été élaborés à partir du cholestérol et du (N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide. Utilisés sous forme de liposomes, ils forment des lipoplexes en interagissant avec des A.N. Enfin, il est également possible de combiner un polymère cationique et un lipide cationique à des A.N. pour former des lipopolyplexes. La particularité des vecteurs développés réside dans la présence de radicaux histidyles qui leur confèrent des propriétés fusiogènes vis-à-vis des membranes cellulaires en milieu acide, tel que la lumière des endosomes, favorisant la délivrance des A.N. dans le cytosol après endocytose.

Après avoir exposé les mécanismes généraux de la réponse immune et le principe de vaccination, je présenterai les cellules dendritiques et leur utilisation en immunothérapie anti-cancéreuse. Je décrirai les différentes techniques et vecteurs utilisés actuellement pour la transfection, ainsi que l'intérêt thérapeutique de l'ARN messenger dans ce domaine. Je présenterai par la suite mes travaux sur l'optimisation des extrémités 5' et 3' de l'ARN messenger et son transfert dans les DCs isolées. Puis, j'exposerai les résultats obtenus sur la caractérisation de complexes ARNm/polymères histidylés/liposomes histidylés (lipopolyplexes) et l'effet vaccinal anti-cancéreux obtenu chez la souris après injection systémique de lipopolyplexes contenant un ARNm d'antigène tumoral. Après une conclusion générale, j'annoncerai différentes perspectives offertes par ces travaux.



## **GÉNÉRALITÉS**

# **CHAPITRE I : MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE LA RÉPONSE IMMUNE ET VACCINATION.**

Un antigène se définit comme une molécule reconnue de manière spécifique par un récepteur clonal du système immunitaire. Ces récepteurs peuvent être des anticorps, des récepteurs des cellules B (BCR) pour les antigènes B, ou encore des récepteurs des cellules T (TCR) pour les antigènes T. Le motif de l'antigène reconnu par ces récepteurs est appelé « épitope » ou « déterminant antigénique ». Parmi ces antigènes certains sont immunogènes, c'est-à-dire capables d'induire une réponse immunitaire spécifique. Pour cela, les déterminants antigéniques sont présentés aux cellules effectrices du système immunitaire par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en présence de molécules de costimulation.

Les cellules dendritiques (DCs) constituent avec les macrophages et les lymphocytes B activés, une catégorie cellulaire spécialisée dans cette initiation de la réponse adaptative appelées « cellules présentatrices d'antigène » ou « antigen-presenting cells » (APCs). En effet, leur fonction première est de dégrader les protéines de pathogènes ou de cellules mortes, et d'exposer les fragments peptidiques résultants à leur surface combinés aux molécules du CMH. La réponse immune induite dépend donc étroitement de la façon dont ces antigènes sont apprêtés par les APCs.

## **I. Les voies de la présentation antigénique.**

Classiquement on distingue deux types de voies de présentation ou apprêtement de l'antigène par les APCs en fonction de son origine.

Les peptides antigéniques issus d'un pathogène intracellulaire (bactéries, virus) ou d'une protéine anormale (antigènes endogènes) sont obtenus après dégradation par le protéasome puis transportés du compartiment cytosolique vers le réticulum endoplasmique (RE). Le peptide est alors fixé sur les molécules du CMH de classe I. Le complexe ainsi formé est ensuite adressé à la membrane où il pourra stimuler les lymphocytes cytotoxiques antigène-spécifiques, ou CTLs, après reconnaissance du complexe CMH-I/peptide par le TCR. Les CTLs activés iront par la suite détruire les cellules infectées ou anormales qui présentent le même couple CMH-I/peptide.

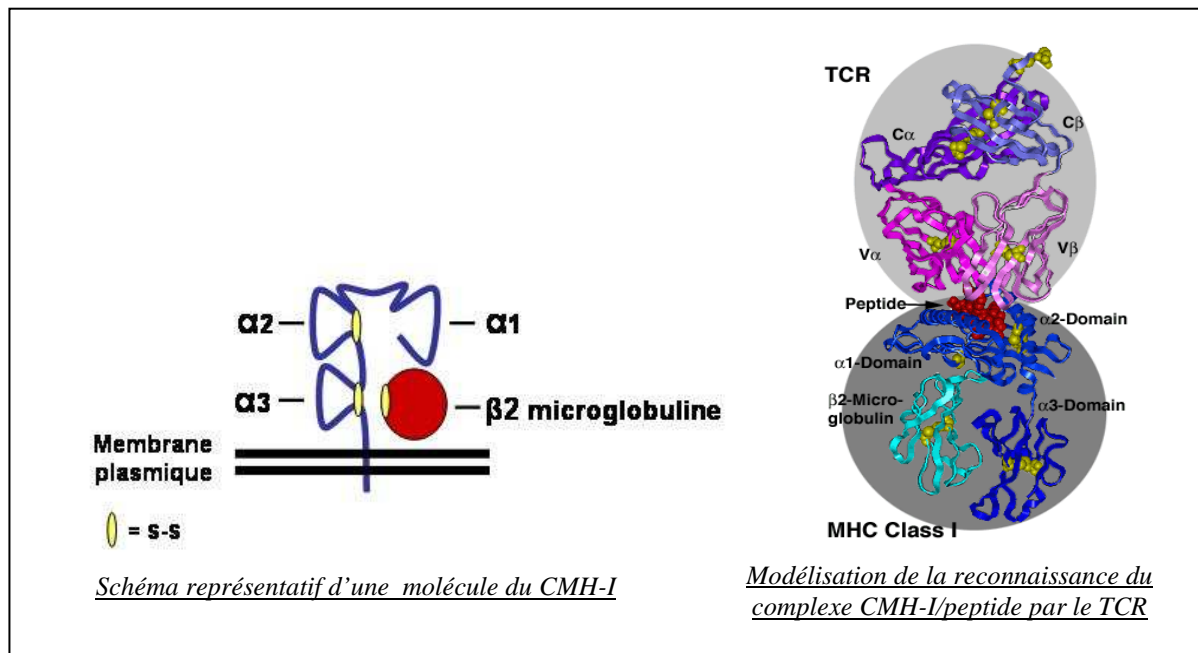
Les pathogènes extracellulaires sont endocytés ou phagocytés par les APCs et dégradés dans des compartiments vésiculaires (lysosomes, phagoso-lysosomes). Les

fragments peptidiques produits ne sont pas transportés vers le RE, mais fixés sur les molécules du CMH de classe II présentes dans ces compartiments. Les complexes CMH classe II/peptide retournent à la surface cellulaire et participent à la stimulation des lymphocytes T auxiliaires, ou T helper. Ces lymphocytes organisent par la suite une réponse immune à médiation cellulaire et/ou humorale contre le pathogène reconnu.

### **I-A. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.**

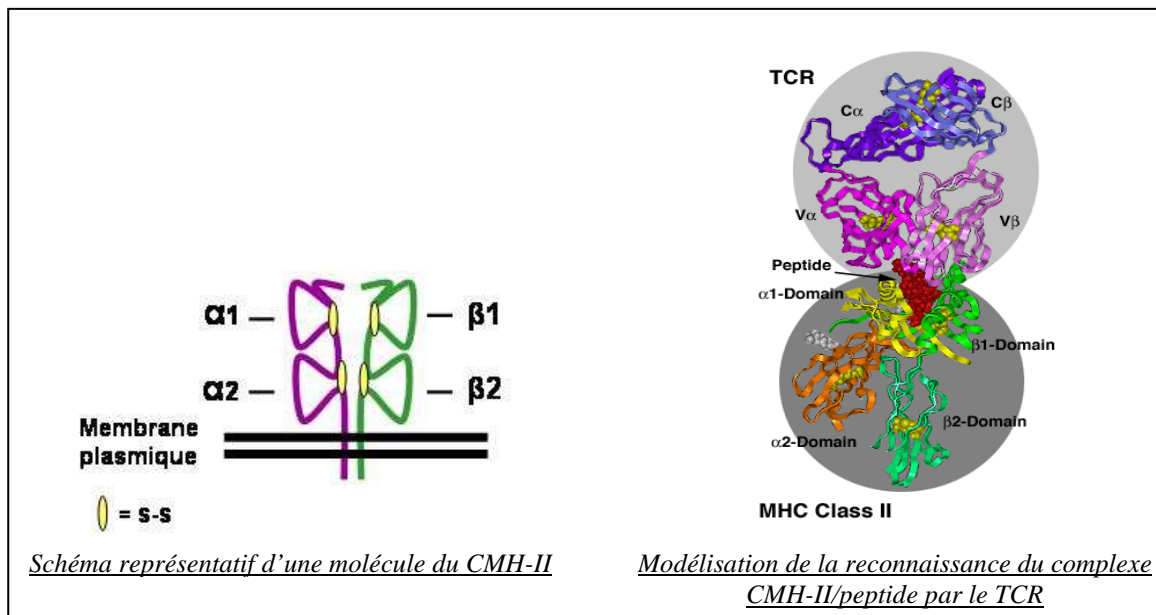
Les molécules du CMH sont donc des structures reporteurs qui indiquent en permanence au système immunitaire si l'intégrité du « soi » est affectée ou non. Dénommé HLA chez l'homme et H-2 chez la souris, le CMH comporte 3 classes de gènes notées I, II et III. Les protéines codées par les gènes de classe I et II appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

Les gènes de classe I codent pour la chaîne lourde  $\alpha$  de 44 kDa des molécules d'histocompatibilité de classe I. Cette chaîne lourde porteuse de la variabilité allélique est organisée en 3 domaines extracellulaires  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , une partie transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (Figure 2). Elle est associée de façon non covalente à la  $\beta 2$  microglobuline ( $\beta 2m$ ), une chaîne légère invariante de 12 kD, codée par un gène non inclus dans le CMH (chr. 15 chez l'homme, chr. 2 chez la souris). Les loci humains HLA-A, -B, ou -C (chr. 6) et murins H-2K, -D ou -L (chr. 17) présentent une expression quasi ubiquitaire et un grand polymorphisme allélique qui témoignent de leur adéquation avec la fonction des CTLs. Au niveau structural, la molécule du CMH-I peut-être décomposée en 2 parties: une « tige » formée par le domaine  $\alpha 3$  de la chaîne lourde qui interagit avec la  $\beta 2$ -microglobuline. Cette tige assure la connexion avec la portion intracellulaire courte de la molécule et supporte du côté extracellulaire la « tête » de la molécule formée des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la chaîne lourde. Ces domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment un plateau constitué par le rapprochement de 8 plis  $\beta$  antiparallèles surmonté de deux hélices  $\alpha$ . Plateau et hélices, tous deux porteurs de la variabilité allélique, délimitent une cavité de 25 Å de long et 10 Å de large fermée à ses deux extrémités. C'est à ce niveau que se fixent les peptides de 8 à 10 résidus issus de la dégradation de l'antigène dans le cytosol pour être présentés au TCR des CTLs (positives pour le co-récepteur CD8). D'autres types spécialisés de lymphocytes, les cellules NK, reconnaissent également le CMH-I. Dans certaines conditions, les NK sont capables de lyser des cellules qui n'expriment plus les chaînes de classe I.



**Figure 2: La molécule du CMH de classe I**

Les gènes de classe II codent pour les chaînes  $\alpha$  (33 kDa) et  $\beta$  (29 kDa) des molécules du CMH de classe II (Figure 3). Toutes deux possèdent 2 domaines extracellulaires  $\alpha1$   $\alpha2$  et  $\beta1$   $\beta2$ , avec des parties transmembranaires et intracytoplasmiques très courtes. Les loci humains HLA-DR, -DQ, ou -DP (chr. 6) et murins H-2E ou -2A (chr. 17) présentent également un fort polymorphisme allélique, mais leur expression est restreinte aux APCs et aux cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC). La structure des molécules du CMH-II est assez proche de celle des molécules du CMH-I. Le « pied » est ici composé par l'association des domaines  $\alpha2$  et  $\beta2$ . Il supporte une « tête » formée par  $\alpha1$  et  $\beta1$ , où chaque domaine contribue à une demi-plateforme de 4 brins et d'une hélice  $\alpha$ . Leur association définit le site de liaison peptidique. Cependant, comparer aux molécules du CMH-I, ce site est plus superficiel et reste ouvert à ses deux extrémités. Ainsi, les peptides présentés de 16 à 25 acides aminés issus de la dégradation lysosomiale dépassent largement ce site. Les lymphocytes capables de reconnaître ces complexes CMHII/peptide expriment le co-récepteur CD4.



**Figure 3: La molécule du CMH de classe II**

Enfin, les gènes de classe III composent un ensemble hétérogène. Certains gènes codent pour des protéines à fonction immunologique telles que des protéines des sous-unités LMP-2, LMP-7 du protéasome, les transporteurs peptidiques TAP-1 et TAP-2, ou encore les molécules du complément C4A et C4B. D'autres gènes codent pour des protéines sans intérêt immunologique direct comme l'hydrolase 21 des hormones stéroïdiennes.

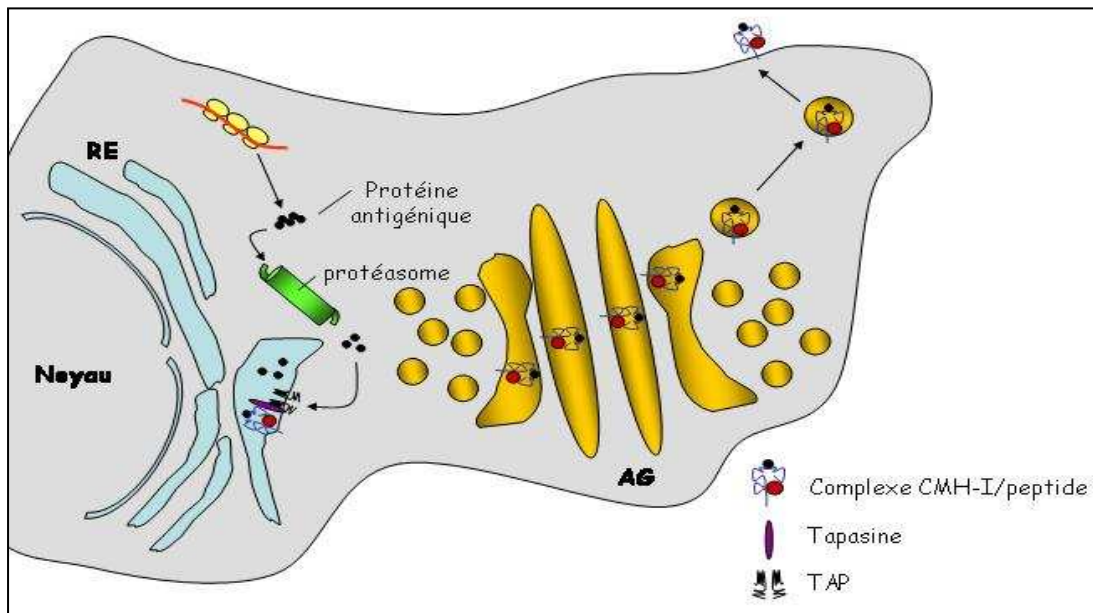
### **1. Voie endogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I.**

Les mécanismes régissant la présentation des antigènes sur les molécules du CMH de classe I sont les mieux connus (Figure 4). Ils utilisent le système de dégradation protéique le mieux conservé au cours de l'évolution : la voie ubiquitine-protéasome. Les protéines antigéniques endogènes, comme les protéines endogènes de l'hôte, vont être associées à une chaîne de polyubiquitine qui favorisera leur entrée dans le protéasome (Rock, York et coll. 2002).

Les DCs ont la particularité de posséder un « immunoprotéasome » inducible par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Groettrup et Schmidtke 1999). Comparé au protéasome standard constitutivement exprimé, l'immunoprotéasome clive préférentiellement les protéines après des acides aminés hydrophobes et basiques, et non après des résidus acides. Le type de résidu retrouvé en C-terminal chez la plupart des peptides antigéniques complexés aux molécules du CMH-I semble indiquer que cet immunoprotéasome est plus efficace que le protéasome standard pour la présentation d'antigène (Sijts, Ruppert et coll. 2000; Sijts,

Standera et coll. 2000). Les peptides de dégradation font de 4 à 24 aminoacides et ceux de plus de 8 résidus pourront être réduits par des peptidases. Les peptides antigéniques libérés sont ensuite transportés jusqu'à la membrane externe du RE et transloqués dans la lumière du RE grâce à des ATPases appelées TAP (« Transporter associated with antigen presentation »).

Au niveau de la membrane interne du RE, le repliement correct de la chaîne lourde du CMH-I et du complexe chaîne lourde du CMH-I/ $\beta$ 2 microglobuline est assuré respectivement par la calnexine et le couple calréticuline/Erp57 respectivement. La fixation des peptides est facilitée par l'interface créée par la Tapasine entre ce complexe et les TAP. Se forme alors une molécule de CMH de classe I chargée et stable. Cette molécule est transportée par ensuite à la membrane plasmique par la voie de sécrétion classique.



**Figure 4: Représentation de la voie endogène présentation sur les molécules du CMH-I**

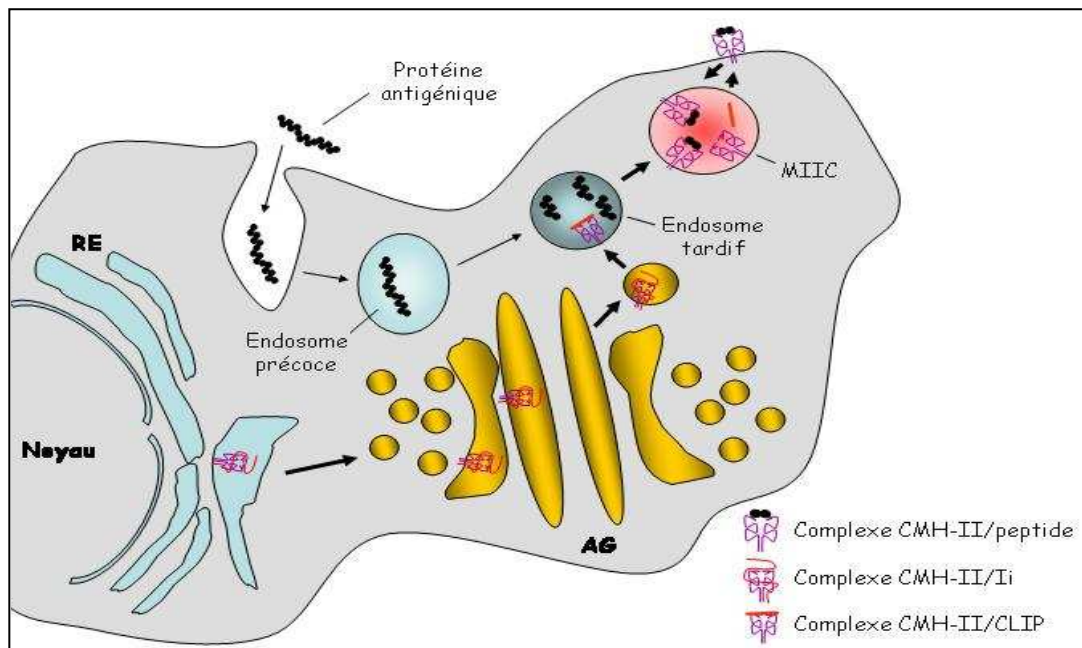
*Abréviations : RE : réticulum endoplasmique, AG : appareil de Golgi.*

## **2. Voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe II.**

La présentation par le CMH de classe II est plus complexe (Figure 5). En effet, les molécules de CMH de classe II sont localisées initialement à la membrane interne du RE où elles sont une forme inactive car complexées à la molécule invariante Ii (CD74)(Bryant, Lennon-Dumenil et coll. 2002). La partie intracytoplasmique de cette dernière comprenant le motif dileucine permet l'adressage du complexe *via* l'appareil de Golgi vers les vésicules de la voie endocytaire que constituent les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les

lysosomes. La dégradation de la chaîne invariante Ii par les protéases contenues dans les endosomes tardifs génère un fragment de 21 acides aminés appelé CLIP (class II associated li peptide). Ce peptide reste associé au site de fixation peptidique de la molécule de CMH-II.

Arrivé dans un compartiment endosomique spécialisé, CLIP est relargué par l'action de la molécule HLA-DM (H2-M chez la souris). Ceci supprime le signal de rétention dans les endosomes et libère le site de fixation qui devient alors accessible aux peptides présents dans ce compartiment. L'accumulation de molécules CMH de classe II néosynthétisées observable dans cet endosome tardif spécialisé a conduit à la dénomination de « MIIC » (CMH class II-rich compartment), ou « CIIV » (class II vesicle). Les molécules CMH de classe II véhiculées vers la surface peuvent être endocytées et recyclées.



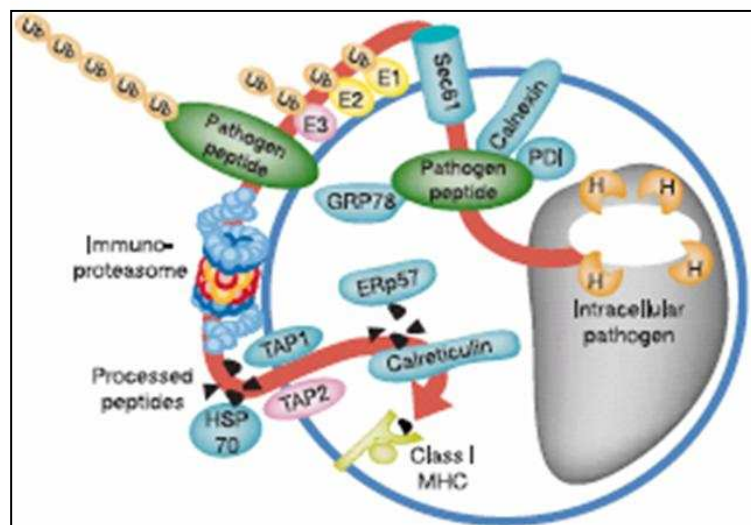
**Figure 5: Représentation de la voie exogène présentation sur les molécules du CMH-II**

*Abréviations : RE : réticulum endoplasmique, AG : appareil de Golgi, MIIC : vésicule de classe II*

### **3. « Présentation croisée » ou voie exogène de présentation sur les molécules du CMH de classe I.**

Plus récemment, il a été montré que les APCs, et plus particulièrement les DCs, possèdent aussi la capacité de présenter des antigènes exogènes sur les molécules de classe I (Ackerman et Cresswell 2004). Ce mécanisme cassant le dogme « antigène endogène-CMH-I / antigène exogène-CMH-II » est appelé « présentation croisée » (cross-présentation ou cross-priming). Cette voie semble nécessaire pour une réponse CTL contre certains pathogènes exogènes et virus n'ayant pas de tropisme pour les APCs et aussi contre certaines cellules cancéreuses. Le phagosome contenant les corps étranger fusionne avec

le RE pendant, ou juste après, l'englobement du pathogène. Ceci permet ainsi la localisation dans le phagosome de protéines normalement présentes au niveau du RE (Guermonprez, Saveanu et coll. 2003). Parmi celles-ci, la protéine Sec61 joue un rôle essentiel. Dans ce contexte, ses fonctions d'import des protéines néosynthétisées dans le RE, d'export et d'adressage des protéines du RE vers le protéasome, sont utilisées pour permettre la libération des protéines antigéniques dans le compartiment cytosolique (Figure 6). Les protéines TAP et les molécules du CMH-I sont également présentes dans ce compartiment suite à la fusion RE/phagosome. Il a été montré par ailleurs que l'immunoprotéasome se lie à la face cytosolique du phagosome (Houde, Bertholet et coll. 2003).



**Figure 6:** *Représentation des mécanismes de cross-présentation*

*D'après Houde M (Houde, Bertholet et coll. 2003)*

Le mécanisme de présentation croisée est donc défini à l'heure actuelle comme le transport des protéines exogènes du phagosome à travers le canal Sec61 et leur dégradation à la face cytosolique de ce compartiment par l'immunoprotéasome. Les peptides antigéniques résultants sont alors réinjectés dans la lumière du phagosome où ils sont pris en charge par les molécules du CMH-I présentes à la membrane interne. Cependant des travaux récents montrent que l'immunoprotéasome ne permet plus la génération de certains antigènes tumoraux endogènes ou dérivés de protéines exogènes qui empruntent la voie de présentation « croisée » (Van den Eynde et Morel 2001). En effet, le peptide antigénique MelanA<sub>27-35</sub> (Annexe I) des cancers à mélanome n'est pas mûré de façon optimale par l'immunoprotéasome et n'est plus présenté à la surface des DC (Morel, Levy et coll. 2000).

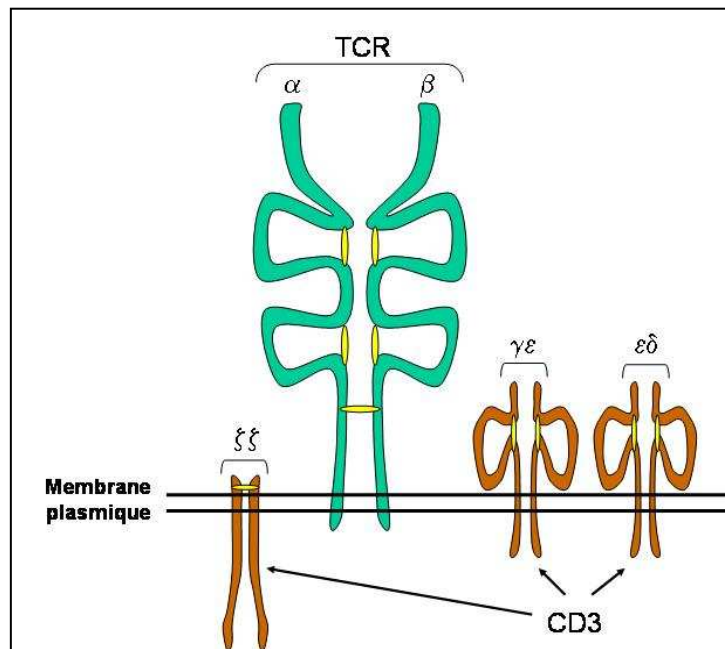


## **I-B. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes T.**

Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur susceptible de reconnaître spécifiquement un peptide antigénique présenté par la molécule de CMH. Ce récepteur T ou TCR (T Cell Receptor) est un récepteur hétérodimérique  $\alpha/\beta$  à activité tyrosine kinase particulier. En effet, les fonctions d'interaction avec le ligand, de phosphorylation et de transduction du signal du TCR sont dissociées et portées par différentes protéines.

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  présentent une structure de type immunoglobuline possédant une partie constante et une partie variable (Figure 7). Certains domaines hypervariables, nommés CDR1, 2, et 3 (Complementarity Determining Region), sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène (Davis et Bjorkman 1988). Un complexe associé appelé CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ ) permet la transduction du signal de reconnaissance de l'antigène et l'expression des chaînes  $\alpha\beta$  à la surface du lymphocyte.

La molécule « corécepteur » CD8 exprimée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+, ou CD4 exprimée par les lymphocytes T auxillaires, est associée au récepteur T et reconnaît une partie conservée au niveau de la « tête » du CMH. Cette molécule permet de stabiliser l'interaction des composants  $\alpha\beta$  du TCR avec le complexe peptide-CMH (Davis, Boniface et coll. 1998).



**Figure 7:** Schéma représentatif du récepteur des lymphocytes T (TCR)

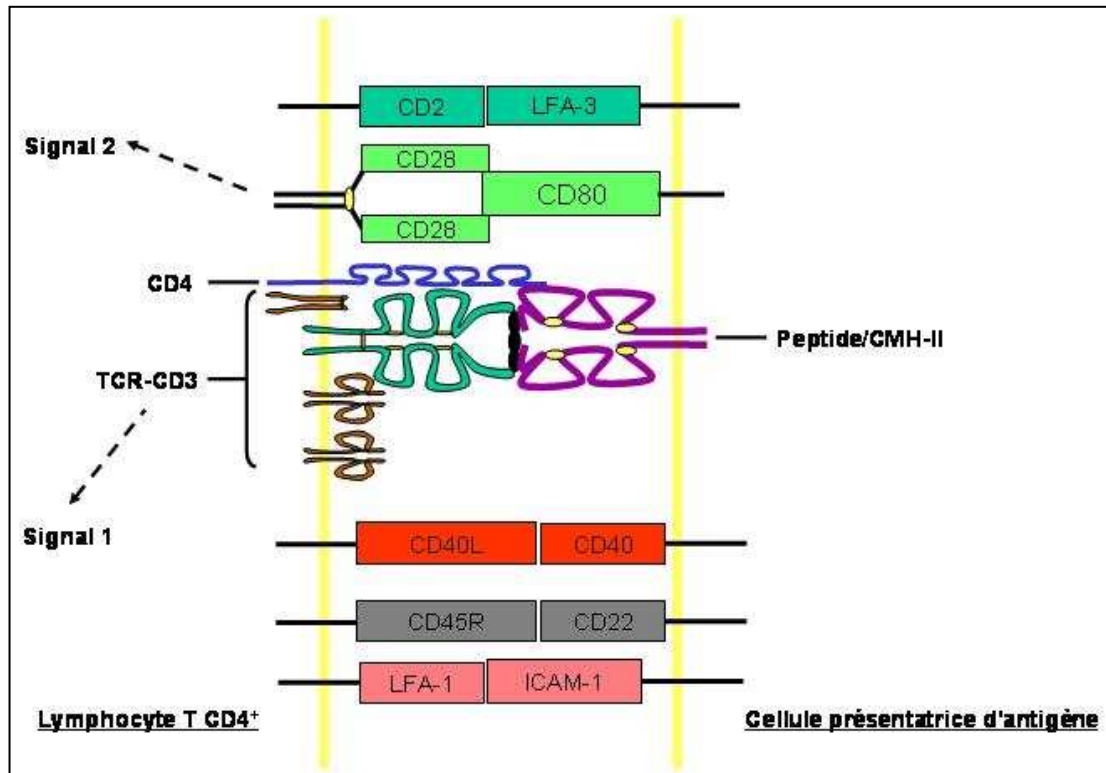
La structure macromoléculaire au point de contact entre le lymphocyte et la cellule cible ou l'APC est désignée sous le terme de « synapse immunologique » (Grakoui, Bromley et coll. 1999; Lanzavecchia et Sallusto 2000). L'engagement du TCR par le complexe CMH/peptide conduit à une réorganisation moléculaire de la synapse immunologique, nécessaire à l'activation du lymphocyte (Lanzavecchia et Sallusto 2000). La reconnaissance du complexe peptide-CMH par le TCR est extrêmement sensible et la présentation d'une centaine de complexes CMH/peptide à la surface de la cellule présentatrice suffit à cette activation (Harding et Unanue 1990; Christinck, Luscher et coll. 1991).

Le modèle le plus répandu pour expliquer ce mécanisme postule l'existence de 2 signaux (Figure 8). Le premier signal est fourni par le TCR des lymphocytes. Dans le cas des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce signal 1 est obtenu quand le TCR interagit avec un complexe Ag/CMH-II présenté par les APCs (Cantrell 1996). Il s'agit bien sûr de la reconnaissance du complexe Ag/CMH-I dans le cas des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Le signal 2, dit de co-stimulation, est lui fourni par l'interaction entre les molécules B7.1 (CD80) sur l'APC et CD28 sur le lymphocyte T. Ce signal 2 ne peut être fourni que par une APC activée. De ce fait, au début d'une réponse antigénique, l'activation d'un lymphocyte T nécessite vraisemblablement un premier contact avec une DC. En l'absence de ce signal 2, le signal 1 rend les lymphocytes T réfractaires à une activation subséquente, c'est le stade d'anergie (Lenschow, Walunas et coll. 1996). Un signal 2 délivré sans le signal 1 est un événement neutre. Ces 2 signaux conduisent à la production de cytokines et à une sélection clonale, c'est-à-dire à l'induction spécifique de la prolifération du lymphocyte activé par le déterminant antigénique présenté. Au cours de cette phase d'expansion se différencient des lymphocytes effecteurs proprement-dit et des lymphocytes mémoires. Lors d'une seconde rencontre avec l'antigène, ces derniers permettront une réponse immune, dite secondaire, plus rapide et plus efficace que lors du premier contact. Ces lymphocytes mémoires sont à la base du mécanisme de vaccination.

Suite à ce mécanisme d'activation, un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> activée pourra prendre le relais et amplifier la réponse immunitaire grâce aux cytokines qu'il sécrète et à l'expression de nouvelles molécules de surface. Ainsi, en exprimant le CD40 ligand (CD40L) qui va reconnaître le CD40 sur une APC au repos, le lymphocyte provoque l'expression de CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) à la surface de cette dernière. Ces 2 molécules de costimulation sont les ligands du récepteur CD28 qui est constitutivement exprimé à la surface des T CD4<sup>+</sup>, y compris des T CD4<sup>+</sup> naïfs. Ainsi, l'APC stimulée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés va être à son tour capable de recruter des T CD4<sup>+</sup> naïfs pour les activer.

Cependant l'ampleur de la réponse immunitaire est finement régulée. Par exemple, les molécules B7 peuvent également être reconnues par CTLA-4. Cet homologue de CD28, de plus haute affinité pour les molécules B7, induit un signal antiprolifératif aux lymphocytes

T CD4<sup>+</sup>. Son expression est régulée au niveau de l'ARNm ainsi que par des mécanismes post-transcriptionnels. Il n'apparaît à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup> que 24 à 36h après leur stimulation.



**Figure 8:** *Schéma de la présentation d'antigène par une APC à un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>.*

### **I-C. Reconnaissance de l'antigène par les Lymphocytes B.**

Les lymphocytes B expriment à leur surface un récepteur susceptible de reconnaître spécifiquement un antigène libre ou apprêté par la molécule du CMH-II. Ce récepteur B, ou BCR (B Cell Receptor), correspond à une molécule d'immunoglobuline membranaire (mIg) fixant l'antigène et de deux hétérodimères Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  transducteurs du signal (Reth 1995). L'immunoglobuline de membrane, comme toute immunoglobuline, est constituée par l'association de deux chaînes lourdes (chaîne H pour « Heavy ») et deux chaînes légères (chaîne L pour « Light ») (Figure 9). Ces chaînes peuvent être décomposées en domaine de 110 résidus amino acides (domaine Ig) contenant une boucle de 60 acides aminés formée par un pont disulfure intrachaîne. Elles contiennent un domaine N-terminal variable (V), dont l'association V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> est porteuse de la spécificité vis-à-vis de l'antigène. Le reste de chaque chaîne de l'Ig a une variation limitée. Ce sont ces parties dites constantes (C) qui définissent les deux sous-types de chaîne légère ( $\lambda$ ,  $\kappa$ ) et les cinq sous-classes de chaîne lourde ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ). Ces parties constantes permettent la liaison entre la chaîne lourde et légère d'un

l'hétérodimère. Celle-ci s'effectue par formation d'un pont disulfure entre les domaines  $C_{H1}$  et  $C_L$ . Les chaînes lourdes possèdent enfin une région charnière riche en proline, entre  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$ , permettant la liaison des hétérodimères H/L entre eux par un pont disulfure. Seules les chaînes lourdes de types  $\mu$  et  $\epsilon$  sont dépourvues de cette région charnière qui est remplacée par un domaine supplémentaire au milieu de la molécule.

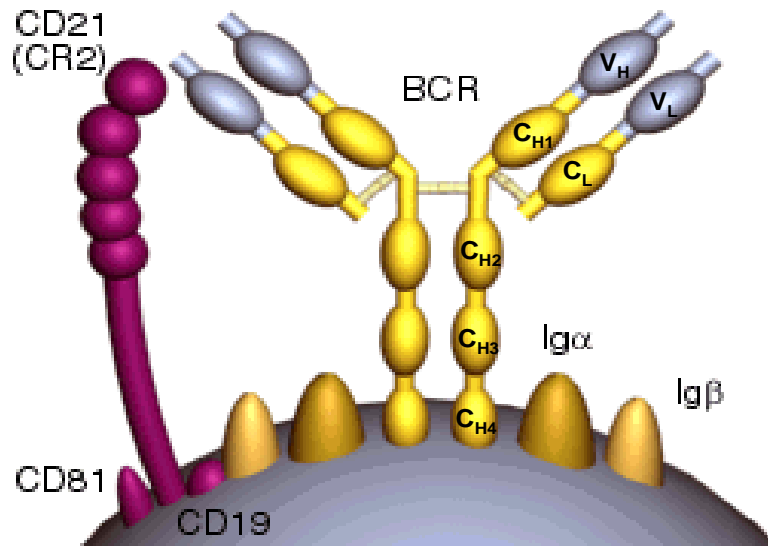
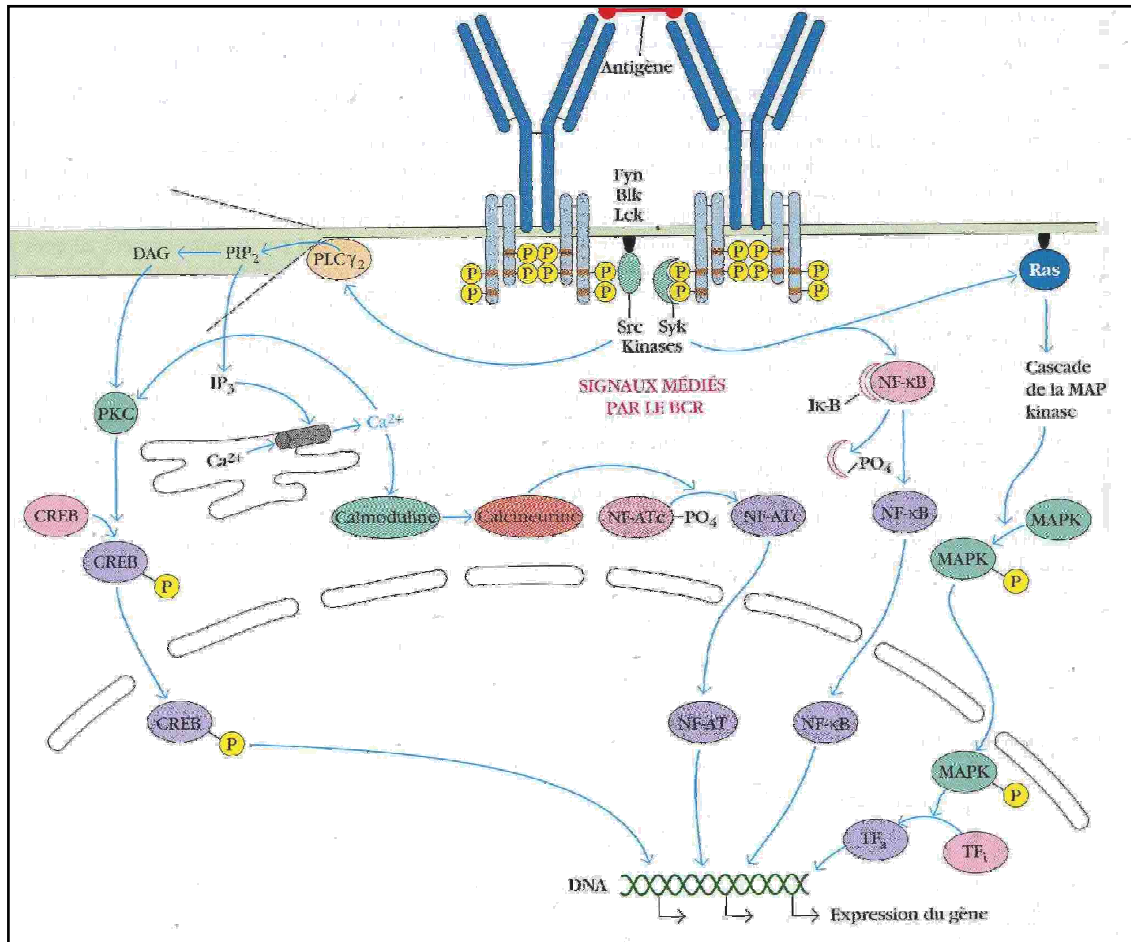


Figure 9: Récepteur des lymphocytes B (BCR)

L'immunoglobuline de membrane présente à la surface des lymphocytes B matures et naïfs est de type IgM ou IgD. Ces Ig possèdent une partie intracellulaire de 3 acides aminés insuffisante pour la transduction du signal d'activation (Figure 10). Au contraire, la chaîne Ig $\alpha$  a une longue queue cytosolique de 61 acides aminés. La chaîne Ig $\beta$  en contient 48. Chacune de ces chaînes comporte un motif ITAM (immuno-receptor tyrosine base activation motif) de 18 acides aminés permettant l'interaction avec plusieurs protéines de signalisation à activité tyrosine kinase de la famille Src (Fyn, Blk, Lck). Les lymphocytes B ont également à leur surface un corécepteur formé de 3 protéines : CD19/CD21/CD81 (Figure 9). CD19 est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines possédant trois domaines extracellulaires immunoglobuliniques et une longue partie intracytoplasmique. Le récepteur CR2 (CD21) est un récepteur du produit de dégradation du système du complément C3d. Enfin, le corécepteur se compose également d'une protéine à 4 domaines transmembranaires appelée TAPA-1 (CD81).

Afin de contrôler plus finement l'activation des lymphocytes B, le BCR est associé de manière constitutive au récepteur CD22 qui délivre un signal négatif. Le signal d'activation ne survient qu'avec le pontage de deux mIg, associées à leur couple Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , par un antigène. Les tyrosines présentes dans les motifs ITAM des parties cytosoliques des

chaînes Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , vont être phosphorylées par les protéines Fyn, Blk ou encore Lck. Ces tyrosines phosphorylées permettent l'ancrage et l'activation de la kinase Syk qui continuera la transduction du signal vers les voies de la phospholipase C $\gamma$ 2 (et donc du DAG et de l'IP $_3$ ), de Ras (et donc des voies MAP Kinases), ou encore de NF- $\kappa$ B.



**Figure 10: Transduction du signal activateur du BCR**

*D'après Goldsby R. et coll. (2000)*

Le corécepteur CD19/CR2/TAPA-1 permet une amplification de ce signal activateur. En effet, le récepteur CR2 se lie au complexe antigène/C3d capté par la mlg du lymphocyte B et ancre ainsi le corécepteur à proximité du BCR. Rapprochant ainsi CD19, les 6 tyrosines présentes dans sa partie intracytoplasmique deviennent des substrats majeurs de l'activité kinase médiée par le BCR activé. Leur phosphorylation permet l'ancrage de nombreuses molécules de signalisation et l'amplification du signal transmis par le BCR.

Cependant, l'activation des lymphocytes B par un antigène protéique soluble nécessite une coopération avec des cellules T auxiliaire (Th) et la formation d'un conjugué T-B. Une fois fixé à la mlg, l'antigène est internalisé par le lymphocyte B puis apprêté en peptides par la voie exogène de présentation antigénique. La fixation de l'Ag par le

lymphocyte B conduit à un premier signal d'activation induisant l'expression des molécules du CMH de classe II et de costimulation B7 (CD80 et CD86). Le lymphocyte B activé devient alors une APC présentant les peptides de l'Ag internalisé au lymphocyte T auxiliaire. Le Th reconnaît le complexe antigène-molécule du CMH-II à la surface du lymphocyte B. Cette reconnaissance, associée à un signal de costimulation par interaction entre les molécules B7 du lymphocyte B et le CD28 du Th, conduit à l'activation du lymphocyte T. En réponse, celui-ci exprime CD40L (CD154) à sa surface qui se lie au CD40 présent à la surface du lymphocyte B. C'est le second et dernier signal activateur pour le lymphocyte B. Ainsi activé, le lymphocyte B exprime alors divers récepteurs aux cytokines à sa surface et notamment à l'IL-2, l'IL-4 et IL-5 sécrétées par le lymphocyte Th. Les cytokines induisent l'entrée en mitose du lymphocyte B nécessaire au mécanisme d'expansion clonale.

## **II. Les réponses immunitaires de type Th1 et Th2.**

La réponse immunitaire spécifique contre la plupart des antigènes est dépendante de lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup> (Th). Deux sortes de réponses immunitaires peuvent être générées par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Le premier type dépend des lymphocytes Th1, et le deuxième des lymphocytes Th2. Le type d'APC, les cytokines présentes lors de la stimulation initiale des T CD4<sup>+</sup>, l'affinité de la liaison Ag/CMH-II, et le type de molécules impliquées dans le signal 2 déterminent si une réponse immunitaire va être de type Th1 ou Th2.

### **II-A. La réponse de type Th1.**

Une réponse immunitaire de type Th1 est dirigée contre un antigène intracellulaire, comme rencontré lors d'une infection virale ou d'un processus oncogène. Une APC (macrophage ou DC) présente des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sur les molécules du CMH-II. La production de l'interleukine-12 (IL-12), stimulent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers une réponse de type Th1. Les DCs ayant ce potentiel sont appelées DC1. Les lymphocytes Th<sub>1</sub> produisent à leur tour de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ . Ces 2 cytokines stimulent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, ainsi que les APCs et amplifient la réponse immunitaire. L'IL-2 favorise l'expansion clonale des T activés après la reconnaissance de l'antigène. L'IFN- $\gamma$  permet induire une réponse antivirale dans les autres cellules de l'organisme, qui sont saines mais exposées à cette cytokine. Parallèlement, les APCs présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sur les molécules du CMH-I. Associée à la stimulation par les T CD4<sup>+</sup>, via les cytokines, cette présentation active les lymphocytes T

CD8<sup>+</sup>. Les clones lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont maintenant capables de reconnaître et de lyser les cellules tumorales ou infectées par un virus présentant le peptide antigénique complexé au CMH-I. Au moins 2 mécanismes différents sont impliqués dans l'éradication des cellules cibles. Le premier consiste en une sécrétion de perforines par les T CD8<sup>+</sup>. Ces protéines s'insèrent dans la membrane de la cellule cible en formant des pores. Ces pores permettent l'entrée des enzymes protéolytiques du lymphocyte CD8<sup>+</sup> dans le compartiment intracellulaire de la cellule cible. Une de ces enzymes, le granzyme B, induit l'entrée en apoptose de la cellule cible en activant directement les caspases effectrices. Un second mécanisme implique le système Fas-Fas ligand (FasL). Il conduit également au déclenchement de l'apoptose de la cellule cible par l'activation de la voie de la caspase 8 (Golstein, Ojcius et coll. 1991).

## **II-B. La réponse de type Th2.**

La réponse Th2 est caractérisée par une étroite collaboration dans la lutte contre le même Ag entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes B. Les lymphocytes B jouent un rôle prépondérant en tant qu'APC. Lors d'une réponse de type Th2, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisent les interleukines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 et favorisent la commutation de classe et la production d'anticorps. Ceci conduit à une réponse immunitaire de type humorale. Le mélange d'IL-2, IL-4 et IL-5 induit la prolifération des lymphocytes B activés. L'IL-6 favorise la différenciation terminale en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Le cocktail IL-4/IL-5, en absence d'IFN- $\gamma$  dans le microenvironnement, induit la commutation de classe d'immunoglobuline vers l'IgE. Or l'IL-4 produit par les lymphocytes Th2 conduit également à la prolifération des mastocytes. Ces cellules sont sensibles à la liaison des IgE à leur surface. Cette liaison d'IgE conduit à la dégranulation et la libération d'histamine et d'autres substances médiant les réactions allergiques.

## **III. Les autres cellules effectrices de la réponse antigénique.**

D'autres cellules que les DCs, les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont impliquées dans l'orientation de la réponse immune et la réponse antitumorale.

### **III-A. Les cellules NK et NKT.**

Les cellules NK (Natural Killer), sont des cellules effectrices de l'immunité innée servant de première ligne de défense à l'organisme. Elles éliminent les cellules cibles sans sensibilisation préalable. Elles sont dépourvues de TCR et de spécificité vis-à-vis d'un peptide antigénique donné. Les cellules NK peuvent être activées par les DCs et produire des cytokines de type I et II et ainsi participer au transfert d'une réponse innée immédiate à une réponse acquise (Zitvogel 2002). En tant que cellules effectrices, elles lysent les cellules présentant une absence ou un faible taux de CMH-I à leur surface (infection virale ou cancer) ou un CMH-I de type allogénique (transplantation, grossesse) (Miller 2001). Leur activité cytotoxique est étroitement régulée par une communication complexe de récepteurs activateurs et inhibiteurs reconnaissant des ligands à la surface des cellules cibles (Long 1999; Soloski 2001). Le mécanisme de reconnaissance des molécules du CMH de ces cellules cibles se fait par des glycoprotéines membranaire de type I et par des récepteurs apparentés aux immunoglobulines à la surface des NK. Dans des conditions physiologiques, les cellules présentant un CMH syngénique induisent un signal inhibiteur dominant dans les NK (Lanier 1998). Il en résulte donc une préservation des cellules du soi normales et une élimination des cellules exprimant un CMH de classe I aberrant (Karre, Ljunggren et coll. 1986; Kim, Iizuka et coll. 2000). Dans le cas de tumeurs exprimant peu ou pas les molécules du CMH-I, l'activité cytotoxique des cellules NK semble être le mécanisme de défense prédominant (Cerwenka, Baron et coll. 2001).

Les cellules NKT (Natural Killer T) ont la particularité de co-exprimer le TCR, caractéristique des cellules T, et le récepteur NK1.1, caractéristique des cellules NK (Porcelli et Modlin 1999). Comme les cellules NK, les NKT peuvent être activées par les DCs et participent au transfert de la réponse innée vers la réponse adaptative. Elles sont capables d'une sécrétion rapide, forte et de façon très polarisée de cytokines de type I (IFN- $\gamma$ ) et II (IL-4). Les cellules NKT reconnaissent un nombre limité d'antigènes. Ces antigènes sont présentés par les molécules non-polymorphiques apparentées au CMH et appelées CD1. Ces molécules de CD1 sont fortement exprimées à la surface des DCs immatures et lient un ensemble restreint d'épitopes inhabituels et essentiellement glycolipidiques. Les cellules NKT sont capables de contrôler le développement de la tumeur, voire d'induire son rejet (Cui, Shin et coll. 1997; Smyth, Thia et coll. 2000). Cependant, leur rôle dans une réponse antigène-spécifique reste à établir. Les cellules NKT semblent être importantes dans les phases d'initiation de la réponse immune et dans l'orientation Th1/Th2 de celle-ci.

### **III-B. Les lymphocytes T régulateurs.**



Les lymphocytes T régulateurs (T reg) sont des suppresseurs professionnels de la réponse immune. Représentant 5 à 10% des T CD4<sup>+</sup>, ils ont la particularité d'exprimer constitutivement le CD25. Ce récepteur n'est exprimé dans les autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qu'après reconnaissance de l'antigène et activation du TCR. Les lymphocytes T reg, constitutivement CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, inhibent les cellules T autoréactives, prévenant ainsi des maladies autoimmunes mais également des réponses antitumorales (Shevach 2001). Les T reg présentent certaines caractéristiques très conservées au cours de l'évolution. Ils ont une capacité limitée à proliférer, expriment de façon constitutive le récepteur CTLA-4 à leur surface et produisent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF-β. Un autre type de lymphocyte T reg, cette fois-ci apparenté aux T CD8<sup>+</sup>, a également été isolé et exprime CD8 en absence de CD28 (Ciubotariu, Colovai et coll. 1998).

#### **IV. La vaccination.**

Le principe de l'immunisation active, c'est-à-dire la mise en place d'une immunité protectrice et d'une mémoire immunitaire, a été découvert par les pratiques de variolisation dès le XI<sup>e</sup> siècle en Chine. Au XVIII<sup>e</sup> siècle en Europe, Daniel Bernoulli démontra que malgré les risques la généralisation de cet acte médical allongeait de 3 ans l'espérance de vie à la naissance. Il avait été également observé, sans se l'expliquer, que les vachers atteints de vaccine, une maladie bénigne transmise par leur vache, étaient protégés contre la variole. Ainsi en 1796, Edward Jenner inocule le virus de la vaccine à un enfant. Celui-ci s'avèrera immunisé contre la variole après 3 mois d'incubation. Le premier « vaccin » était né. Il faudra attendre les travaux de Robert Koch sur la relation entre microbes et infections, puis ceux de Louis Pasteur et de ses collaborateurs Roux et Duclaux, pour que le principe d'action de la vaccination soit établi. En 1881, Pasteur vaccine un troupeau de moutons contre le choléra, et en 1885 il met au point le vaccin contre la rage. Depuis, de nombreux autres principes vaccinaux ont été développés. En fonction du type de principe actif utilisé, on peut distinguer les vaccins antiviraux ou antibactériens utilisant :

des organismes pathogènes entiers :

- virus ou bactéries atténués : Bacille de Calmette-Guérin ou BCG (*Mycobacterium bovis*) contre la tuberculose,
- virus ou bactéries inactivés par la chaleur ou par voie chimique comme l'utilisation du formaldéhyde : Coqueluche,

des macromolécules purifiées :

- polysaccharides : Méningite, pneumonie à pneumocoques,

- toxoïdes : tétanos,
- protéines recombinantes : Hépatites B (HBsAg),
- peptides synthétiques,
- acides nucléiques : ADN ou ARN,

des organismes modifiés :

- virus dérivés de la vaccine, du canarypox, du polyovirus,
- souches bactériennes atténuées dérivées de *Salmonella typhimurium*,
- cellules dendritiques chargées.

Les progrès de la médecine laissent envisager aujourd'hui deux grandes familles de vaccins : les vaccins préventifs et les vaccins thérapeutiques. L'objectif d'un vaccin préventif est de protéger la population contre la maladie avant tout contact avec le pathogène. Il s'agit donc d'éduquer le système immunitaire pour qu'il reconnaisse un pathogène avant l'apparition de symptôme et qu'il puisse l'éliminer définitivement. Il est donc administré à un sujet « sain » afin que son intégrité soit préservée. Le vaccin thérapeutique est lui administré dans un contexte pathologique. Il a lui pour objectif de guérir le sujet atteint en stimulant son système immunitaire pour permettre d'enrayer la progression de la maladie, voire de l'éradiquer.

Enfin dans les stratégies vaccinales, deux approches distinctes peuvent être envisageables. La première consiste à l'injection directe de particules antigéniques au sujet. Cette stratégie (*in vivo*), simple dans son acte, est la plus commune et la plus adaptée aux vaccins préventifs. La seconde stratégie, (*ex vivo*) plus contraignante, est plus dédiée aux vaccins thérapeutiques. Par exemple, dans le cas d'une immunothérapie cellulaire, elle consiste à prélever les DCs ou leurs précurseurs du patient et les mettre en culture afin de procéder aux étapes de différenciation, de maturation et de chargement par l'antigène. Ces DCs modifiées sont ensuite réinjectées au patient. Cette approche est actuellement utilisée pour le développement de vaccins antitumoraux.

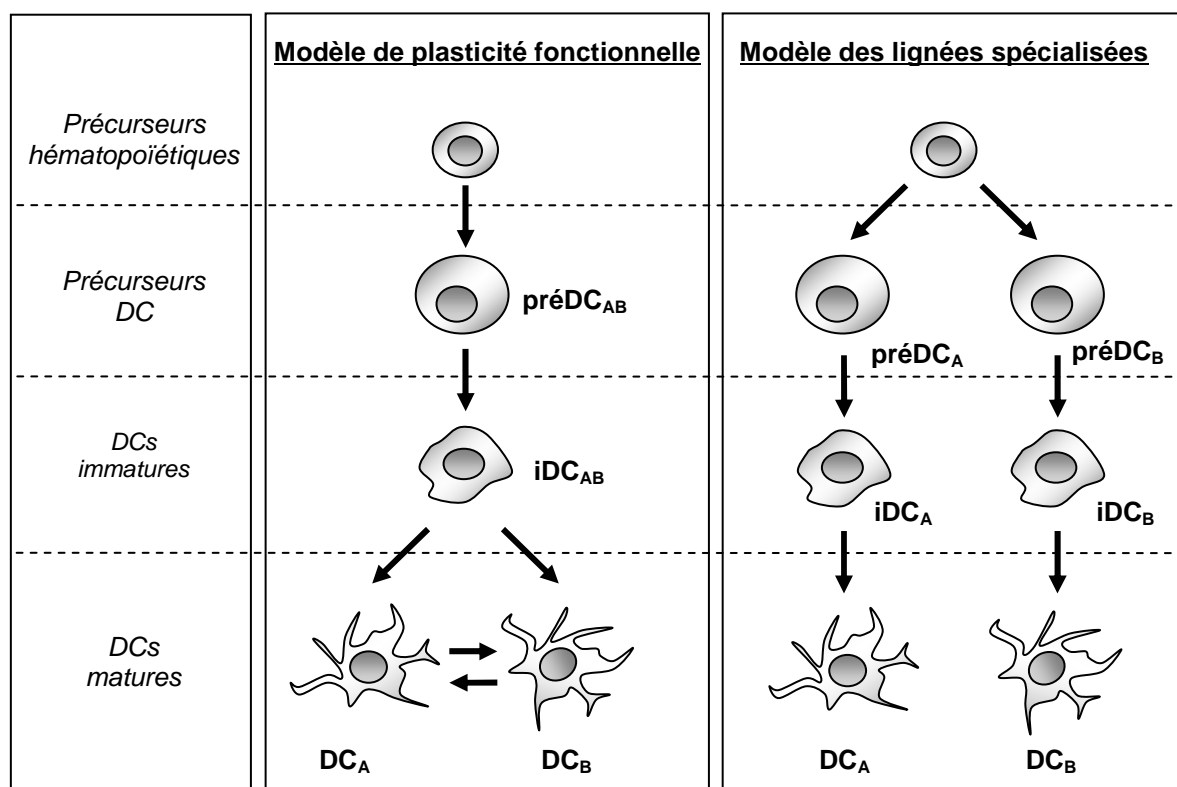
## **CHAPITRE II : LES CELLULES DENDRITIQUES.**

L'amélioration des connaissances sur la mise en place d'une mémoire immunitaire, base du principe de vaccination, a mis en avant l'importance des cellules dendritiques (DCs). Ceux sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui initient et régulent les réponses immunes. Elles peuvent être considérées comme les « chefs d'orchestre » de ces régulations complexes et toute action vaccinale agit par l'intermédiaire de ce type cellulaire.

### **I. Découverte et caractérisation des DCs.**

Les DCs ont été décrites initialement par Paul Langerhans en 1868 dans l'épithélium de la peau. Puis en 1973, Steinman et Cohn isolent un type rare de cellules spléniques impliquées dans l'induction des réponses immunes (Steinman et Cohn 1973). La difficulté à isoler des DCs à partir de tissu fut pendant longtemps un facteur limitant à leur caractérisation. Ce n'est que dans les années 90, avec les progrès dans le domaine des cultures primaires, que la production *in vitro* de DCs humaines et murines a pu être entreprise, facilitant ainsi leurs études. Plusieurs sous-populations de DCs peuvent être caractérisées en fonction de leur morphologie, de leur profil d'expression de marqueurs et de sécrétion de cytokines, de leur localisation tissulaire, de leur besoin en facteurs de croissances et de leur réponse à des stimuli activateurs. Bien que le modèle murin soit un modèle d'excellence en immunologie, il existe des différences notables entre les DCs isolables chez la souris et chez l'homme. Les marqueurs pour un même type fonctionnel de DCs peuvent varier entre ces deux espèces, et l'équivalent murin d'une sous-population de DCs humaines n'est pas forcément isolable.

Cependant, les correspondances inter-espèces sont suffisantes pour définir deux modèles explicatifs de la génération des sous-populations de DCs (Figure 10). Le « modèle de plasticité fonctionnelle » considère que toutes les sous-populations de DCs (DC<sub>A</sub> ou DC<sub>B</sub>) correspondent à des états d'activation différents d'un seul type de lignée de DCs. Ses divers états sont exclusivement sous la dépendance de l'environnement et de signaux locaux. Au contraire, le « modèle des lignées spécialisées » suggère que des signaux précoces agissent au niveau d'un précurseur (préDC<sub>A</sub> ou préDC<sub>B</sub>) induisant une séparation en divers lignages cellulaires. Chacun de ces lignages aboutissant à un type spécialisé de DCs.



**Figure 11 : Modèles explicatifs de la génération des sous-populations de DCs**

En réalité, les données recueillies quant au développement et à la différenciation des DCs semblent indiquer qu'il s'agit d'un mélange complexe de ces deux modèles. Ces mécanismes laissent part à une large plasticité tant au niveau des précurseurs qu'au niveau des DCs.

A l'origine, les similitudes entre des DCs spléniques isolées par Steinman et Cohn (Steinman et Cohn 1973) et les monocytes-macrophages ont conduit à leur attribuer une origine myéloïde. Ces DCs myéloïdes engendrent deux grandes sous-populations qui sont se retrouvent dans tous les tissus, les DCs interstitielles (int-DCs), ou au niveau de l'épiderme, les cellules de Langerhans (LCs). Cette origine myéloïde des DCs fut confirmée par l'obtention de DCs à partir de monocytes ou de précurseurs intermédiaires chez la souris et l'homme (Caux, Vanbervliet et coll. 1996; Caux, Massacrier et coll. 1997). Les int-DCs et les LCs présentent la capacité de sécréter d'importante quantité d'IL-12 en réponse aux stimuli activateurs et d'induire la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. Cependant, seules les int-DCs sécrètent l'IL-10 nécessaire à la différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Caux, Vanbervliet et coll. 1996; Caux, Massacrier et coll. 1997). Les LCs semblent particulièrement efficaces pour l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques.

D'autres expériences *in vitro* et *in vivo* ont conduit à attribuer une origine lymphoïde à certaines sous-populations de DCs. En effet, au niveau du thymus existent des précurseurs thymiques capables de générer les lymphocytes B et T ainsi que des cellules NK, mais pas de cellules myéloïdes. En recherchant l'origine des DCs présent dans le thymus, Ardavin C. et coll. (Ardavin, Wu et coll. 1993) ont démontré la capacité de ces précurseurs thymiques murins à générer l'ensemble de la population tissulaire de DCs. Les mêmes observations ont pu être faites pour les DCs thymiques humaines. Ces DCs lymphoïdes représentent également la majorité des DCs spléniques.

Les DCs d'origine myéloïde et lymphoïde ont cependant en commun l'expression du marqueur de différenciation CD11c. Leur ségrégation chez la souris se fait classiquement selon l'expression d'un autre marqueur, le CD8 $\alpha$ . Ainsi les DCs d'origine myéloïde sont CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> et les DCs d'origine lymphoïde CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Banchereau, Briere et coll. 2000). Des travaux récents ont montré qu'une classification des DCs ne pouvait pas être aussi simpliste. En effet, les deux types de cellules précurseurs sont capables de générer *in vitro* aussi bien des DCs CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> que des CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et semblent dériver d'un progéniteur hématopoïétique commun de la moëlle osseuse (Traver, Akashi et coll. 2000; Manz, Traver et coll. 2001).

La population des DCs plasmacytoïdes (pDCs) semble toute fois encore plus délicate à classer. Découvertes dans des ganglions lymphatiques pathologiques humains, les pDCs présentent un aspect morphologique de plasmocytes et sont capables de sécréter très rapidement de grande quantité d'une cytokine antivirale, l'IFN- $\alpha$ , en réponse à une infection virale (Siegal, Kadowaki et coll. 1999) ou à une stimulation par des ADN à motifs CpG (Bauer, Redecke et coll. 2001; Nakano, Yanagita et coll. 2001). Les pDCs représentent donc la première barrière antivirale et agissent comme acteur de l'immunité innée. Mais leur activation conduit également à l'induction d'une réponse immune et agissent à ce titre comme acteur de l'immunité adaptative (Kadowaki, Antonenko et coll. 2000). Récemment, l'équivalent murin des pDCs humaines a été isolé et caractérisé (Nakano, Yanagita et coll. 2001).

## II. Les DCs murines.

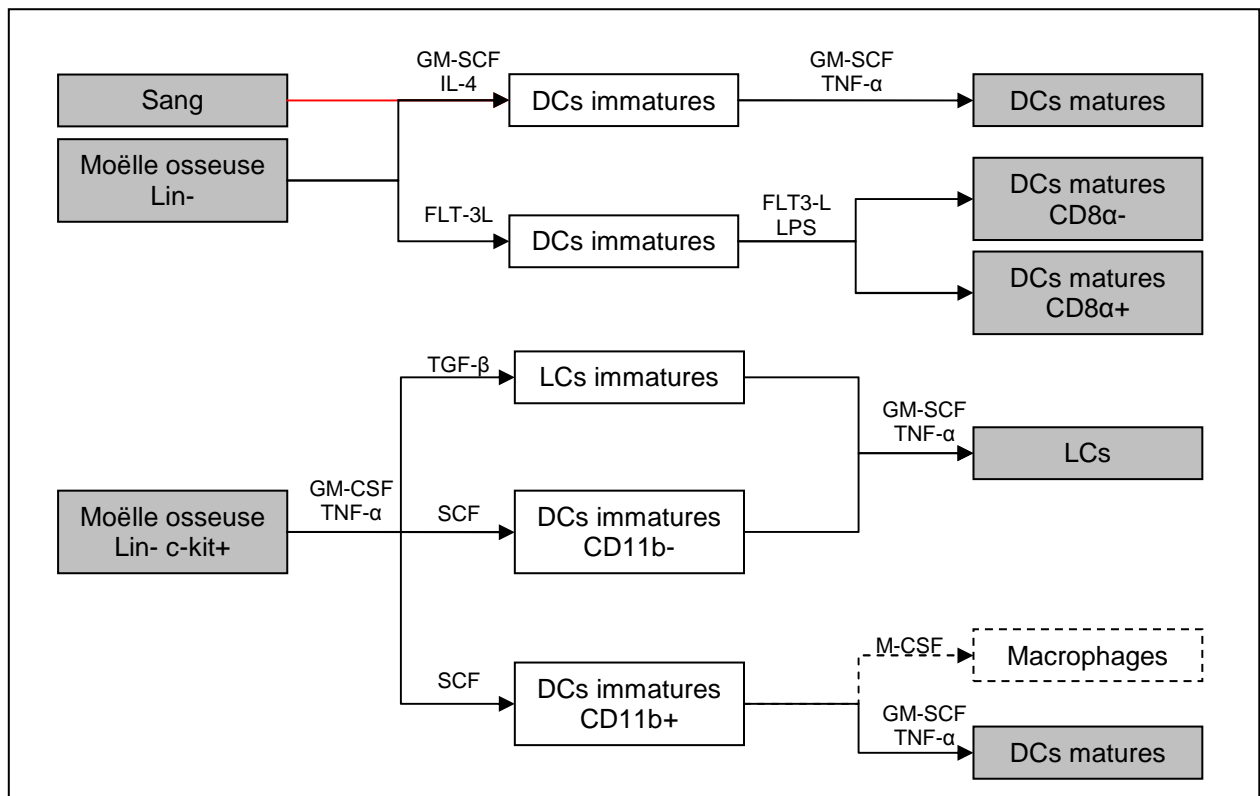
Les DCs murines peuvent être classées en plusieurs sous-catégories en fonction de l'expression de différents marqueurs de surface. Les DCs murines matures expriment CD11c, les molécules de co-stimulation CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), ainsi qu'un niveau variable de molécules du CMH-II. D'autres marqueurs sont également utilisés tels que CD11b (chaîne  $\alpha_M$  de Mac-1), CD4, CD8 $\alpha$  ou encore CD205 (DEC 205, DC-SIGN). Sur la base de ces marqueurs, 5 sous-populations de DCs murines ont pu être identifiées dans les organes lymphoïdes (Tableau 1). Trois d'entre-elles sont localisées au niveau de la rate: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. La zone marginale de la rate contient majoritairement des CD8<sup>-</sup> (Vremec, Pooley et coll. 2000), alors que la zone T est préférentiellement colonisée par les CD8<sup>+</sup>. Toutefois une infiltration de CD8<sup>-</sup> dans cette dernière région splénique est observable dans un contexte infectieux (De Smedt, Pajak et coll. 1996). La sous-population CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD205<sup>hi</sup>, bien qu'isolable dans les ganglions lymphatiques et la rate, représente la grande majorité des DCs thymiques. La population de DCs CD11b<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> est présente dans tous les ganglions lymphatiques, avec une expression variable de CD205 (Anjuere, Martin et coll. 1999). Enfin, au niveau de la peau on trouve la population CD11b<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup>CD205<sup>hi</sup>, également caractérisée par sa forte expression de langherine, et qui correspond aux cellules de Langherans (Henri, Vremec et coll. 2001).

Tableau 1 : Répartition des DCs murines in vivo.

Phénotype  Localisation	CD11b <sup>-</sup> DCs « lymphoïdes »	CD11b <sup>+</sup> DCs « myéloïdes »			
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD205 <sup>hi</sup>	CD4 <sup>+</sup>  CD8 <sup>-</sup> CD205 <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup>		
			CD8 <sup>-</sup>		CD8 <sup>low</sup> CD205 <sup>high</sup>
			CD205 <sup>-</sup>	CD205 <sup>+</sup>	
Rate	++ (Zone T)	+++ (Zone marginale)	+	-	-
Thymus	+++	-	-	-	-
Ganglions lymphatiques	+	-	+++	++	-
Peau	+	-	+	+	+++

L'approche la plus courante pour l'obtention de DCs murine *in vitro* consiste à la mise en culture des précurseurs en présence de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor) et de TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (Figure 12). Ainsi, les précurseurs du sang périphérique, ou les cellules souches Lin<sup>-</sup> isolées de la moelle osseuse (BM), cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4, puis mis en maturation en présence de GM-CSF et de TNF- $\alpha$ , permettent l'obtention de DCs matures phénotypiquement homogènes, n'exprimant pas CD8 $\alpha$  (Schreurs, Eggert et coll. 1999). La culture de ces mêmes précurseurs Lin<sup>-</sup> en présence de GM-CSF, de SCF (stem cell factor) et de TNF- $\alpha$ , suivi d'une maturation en GM-CSF et TNF- $\alpha$ , conduit à 2 types de DCs. On peut ainsi distinguer un type s'apparentant aux DCs des organes lymphoïdes et issues de DCs immatures CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, et un autre s'apparentant aux LCs, issues des CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> (Zhang, Harada et coll. 1998). Les précurseurs Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> mis en présence de GM-CSF, de TNF- $\alpha$  et de TGF- $\beta$  suivi d'une maturation en GM-CSF et TNF- $\alpha$ , aboutissent également à la génération de LCs (Zhang, Zhang et coll. 1999). Enfin la culture de cellules Lin<sup>-</sup> en présence uniquement de FLT3-L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) suivi d'une maturation par LPS (Lipopolysaccharide), ou IFN- $\alpha$ , donne des DCs CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>hi</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> et CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Ces DCs se rapprochent le plus de celles isolables *in vivo* (Brasel, De Smedt et coll. 2000).



**Figure 12 : Voies de différenciation *in vitro* des DCs murines.**

### **III. Les DCs humaines.**

Le sang est la principale source des DCs humaines étudiée. Son contenu en DCs est très hétérogène, allant de précurseurs aux DCs immatures. Leur phénotypage met en évidence plusieurs états d'activation différents plus qu'une ségrégation de lignées (Hart 1997). La comparaison avec les études plus poussées effectuées chez la souris est limitée par l'absence d'expression du marqueur CD8 sur les DCs humaines. Ainsi l'équivalent des DCs murines matures CD8<sup>+</sup> n'a pu encore être identifié. Les LCs se distinguent en un type particulier de DCs, CD1a<sup>+</sup>E-cadh<sup>+</sup>langerin<sup>+</sup>, présentant des granules de Birbeck. Les études des DCs présentent dans les organes lymphoïdes ont montré une grande hétérogénéité dans l'expression des marqueurs CD4, CD11b et CD11c (McIlroy, Autran et coll. 1995), mais la phylogénie reste difficile à établir. C'est au niveau thymique que l'identification de différentes populations de DCs est la plus évidente. La majorité des DCs thymiques ont en effet une absence de marqueurs myéloïdes avec un phénotype CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45RO<sup>low</sup>. Ces caractéristiques tendent à les rapprocher des DCs CD8<sup>+</sup> thymiques murines, dites « lymphoïdes ». Une minorité de DCs thymiques humaines sont au contraire de type CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>CD45RO<sup>hi</sup> et expriment des marqueurs myéloïdes, ce qui les caractériserait comme l'équivalent des DCs « myéloïdes » CD8α<sup>-</sup> murines.

Deux grands types de préparations de DCs humaines *in vitro* sont utilisés (Figure 13). On pratique la différenciation des cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral-blood monocytes cells ou PBMC) ou de précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (bone-marrow derived cells ou BMDC). Après une première phase de différenciation, elles sont classiquement suivies d'une phase de maturation. Des DCs immatures sont obtenues par culture de monocytes en présence de GM-CSF et d'IL-4. Leur maturation est obtenue à l'aide de GM-CSF et de TNF-α (Sallusto et Lanzavecchia 1994). Cette maturation peut également être effectué avec du LPS, de l'IFN-γ ou encore du CD40L. Cependant ces stades de différenciation et de maturation semblent réversibles comme il a été observé lorsque des cytokines étaient éliminées du milieu de culture (Romani, Reider et coll. 1996; Nelson, Strobl et coll. 1999). La culture des monocytes en présence de GM-CSF, d'IL-4 et de TGF-β donne à des cellules de types LCs. Leur maturation s'effectue par incubation dans du milieu complémenté en GM-CSF, TNF-α et IL-1. Le même type de différenciation peut être obtenu à partir de DCs CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> isolées du sang périphérique (Geissmann, Prost et coll. 1998; Ito, Inaba et coll. 1999).

Les précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> sont obtenus à partir du sang de cordon ombilical (Caux, Vanbervliet et coll. 1996) ou de la moelle osseuse (Caux, Dezutter-Dambuyant et coll. 1992). En les cultivant en présence de GM-CSF et de TNF-α, ils génèrent



2 types de DCs immatures identifiables par leur expression mutuellement exclusive de CD14 et CD1a. Dans les mêmes conditions de culture, les précurseurs CD14<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> évoluent vers un phénotype de DCs matures n'exprimant pas la molécule d'adhésion E-cadhérine (E-cadh<sup>-</sup>), semblables à celles du derme ou des organes lymphoïdes. Leur capacité à donner également des macrophages en présence de M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) indique une origine myéloïde de ces précurseurs (Caux, Vanbervliet et coll. 1996). La mise en culture en présence de TGF- $\beta$  de la population CD11b<sup>-</sup> de ces précurseurs conduit leur différenciation en LCs (Jaksits, Kriehuber et coll. 1999). Les intermédiaires CD14<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup> génèrent quant à eux directement des DCs matures E-cadh<sup>+</sup>langerin<sup>+</sup> semblables aux LCs lorsqu'ils sont cultivés en présence de GM-CSF et de TNF $\alpha$ . Enfin, il a été montré que parmi les précurseurs CD34<sup>+</sup>, la sous-population CD45R<sup>-</sup>IL-3R $\alpha$ <sup>-</sup> peut donner des DCs de type plasmacytoïde en présence de FLT3-L seul (Blom, Ho et coll. 2000). Leur maturation peut être induite à l'aide d'IL-3 accompagné de TNF- $\alpha$  ou de CD40L (Grouard, Risoan et coll. 1997; Kohrgruber, Halanek et coll. 1999).

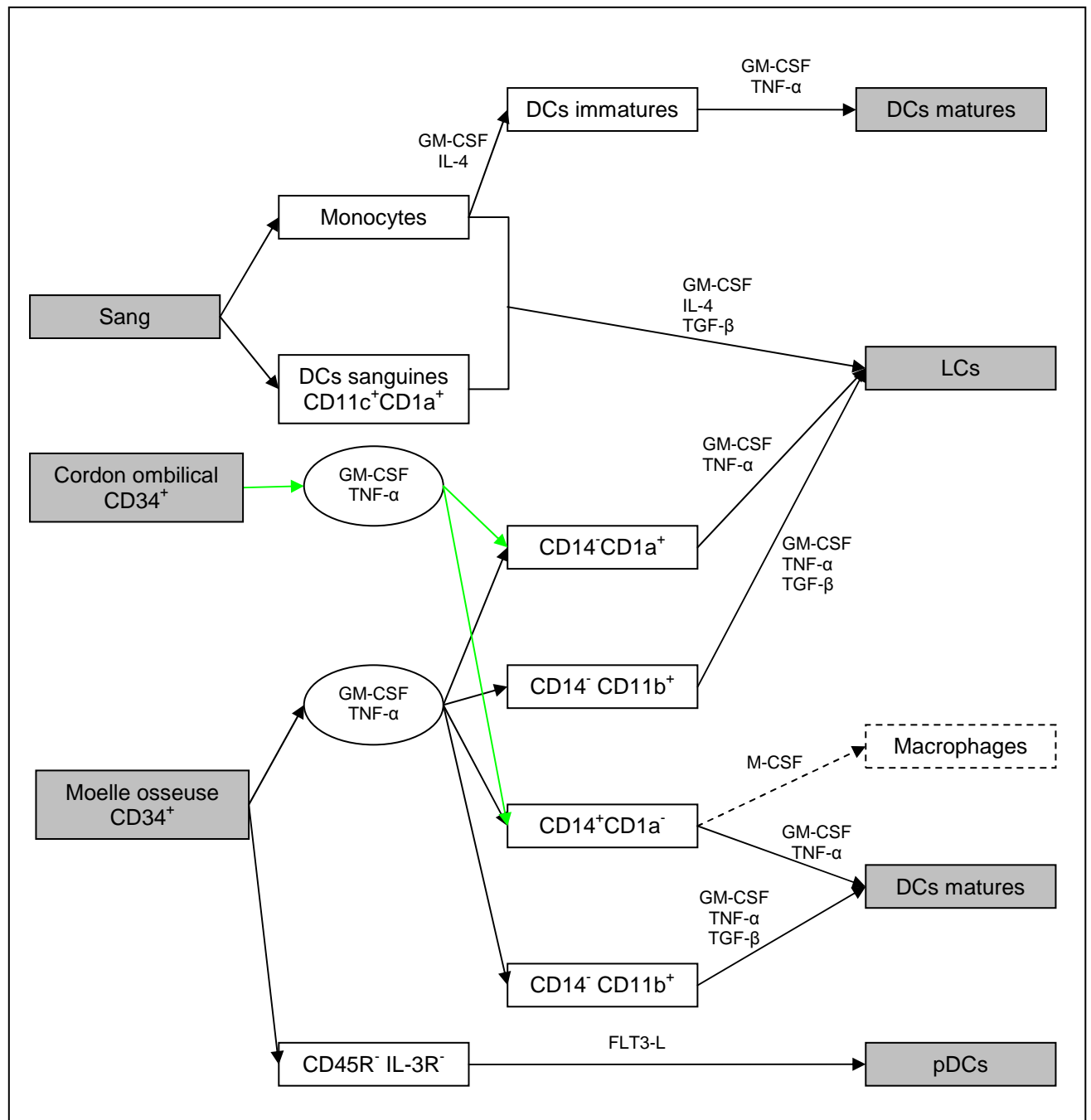
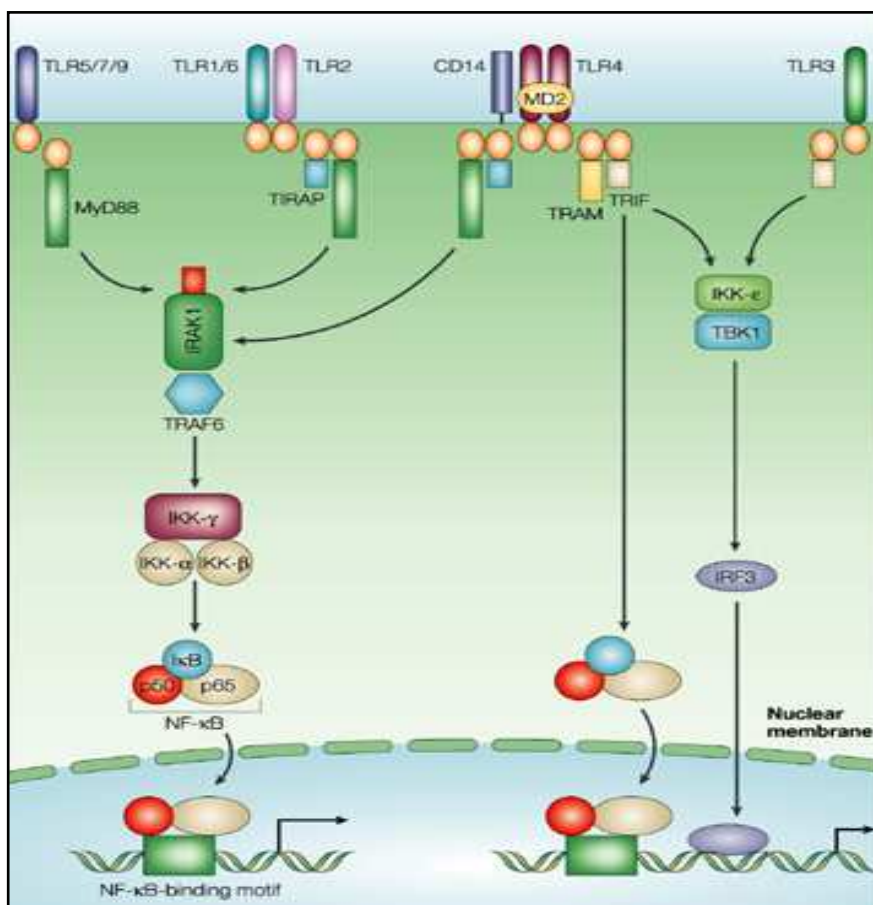


Figure 13: Voies de différenciation in vitro des DCs humaines.

#### **IV. La génération de DCs en vue d'applications cliniques.**

De part la nécessité d'un grand nombre de cellules nécessaires pour une approche de thérapie cellulaire, la génération de DCs *in vitro* est un facteur prépondérant et qui doit être parfaitement maîtrisé. Actuellement, la voie la plus utilisée dans cette stratégie consiste à obtenir des DCs immatures à partir de monocytes sanguins (Mo-DCs, Monocytes derived-dendritic cells) cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4. Cette approche permet l'obtention d'une population homogène de DCs immatures la maturation est induite par l'ajout de TNF- $\alpha$ . Or cette étape de maturation semble cruciale dans l'utilisation des DCs en immunothérapie. Il a été montré qu'une réponse immune efficace nécessite l'injection de DCs matures (Thurner, Haendle et coll. 1999) et que dans ce contexte, une amplification de la fonction des CD8<sup>+</sup> et une orientation des CD4<sup>+</sup> vers la sécrétion d'IFN- $\gamma$  était observable (Schuler-Thurner, Schultz et coll. 2002). Au contraire, l'injection de DCs immatures peut conduire à la mise en place d'une tolérance périphérique vis-à-vis de l'antigène (Dhodapkar, Steinman et coll. 2001).

L'optimisation de cette étape de maturation est donc un enjeu thérapeutique majeur et de nombreux facteurs de maturation sont apparus dans les protocoles de culture. Ainsi, on peut citer l'utilisation de ligands des récepteurs Toll-like (TLRs) tels que le poly I:C (Kalady, Onaitis et coll. 2002), pour le TLR3, les ADN CpG, pour le TLR9, ou encore l'utilisation d'activateurs de reconnaissance antigénique tel que CD40L (Banchereau, Briere et coll. 2000). Les TLRs stimulés induisent une voie de signalisation commune impliquant la protéine adaptatrice MyD88 et conduisant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP1 *via* l'intermédiaire d'un certain nombre de protéines telles que MyD88, IRAK et TRAF6 (Figure 14). Certains TLRs, comme le TLR3, peuvent également activer le facteur de transcription IRF3 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRIF. Les facteurs de transcription ainsi activés permettent l'expression des cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et les IFN- $\alpha$  et - $\beta$ .



**Figure 14: TLR et voies de signalisation**

*D'après Akira et Takeda (Akira et Takeda 2004)*

La réinjection de DCs implique également de connaître leur biodistribution dans l'organisme receveur. La migration des DCs est guidée par les interactions entre ses récepteurs aux chimiokines et leurs ligands. Ainsi, l'expression de CCR7 sur les DCs matures et leur capacité à répondre à des chimiokines tels que CCL19 et CCL21 est un paramètre important pour la colonisation de la zone T des ganglions lymphatiques (Sallusto, Schaerli et coll. 1998; Thurner, Roder et coll. 1999; Caux, Vanbervliet et coll. 2002; Scandella, Men et coll. 2002). La prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) semble être un facteur important dans l'expression de CCR7 par les Mo-DCs. Cependant l'IL-4 utilisée dans lors de la préparation des DCs interfère avec la production de PGE<sub>2</sub> et réduit ainsi la mobilité des DCs (Scandella, Men et coll. 2002). La PGE<sub>2</sub> malgré cet atout est suspectée d'induire des DCs à orientation de type Th2, et n'est donc pas systématiquement utilisée dans les protocoles de maturation. Des études récentes ont mis en évidence *in vivo* une forte collaboration entre les DCs et les cellules NK. Ces observations ont permis de démontrer que la production d'IFN- $\gamma$  par les NK oriente efficacement les DCs vers un profil de DC1 et donc une réponse Th1 (Mailliard, Son et coll. 2003; Martin-Fontecha, Thomsen et coll. 2004). Un nouveau protocole de maturation des Mo-DCs utilisant un cocktail TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et INF- $\gamma$  a donc été proposé

(Mailliard, Wankowicz-Kalinska et coll. 2004). Il a été montré que la maturation des DCs après transfert de gène permet d'augmenter l'efficacité de présentation antigénique quelque soit la technique de transfert utilisée (Van Tendeloo, Ponsaerts et coll. 2001; Kalady, Onaitis et coll. 2002; Onaitis, Kalady et coll. 2003). Une stratégie de maturation séquentielle a été développée par Kalady et coll. La première étape de maturation après transfection permet d'augmenter l'expression de CD40 et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 à la surface des DCs. Une deuxième étape de maturation par stimulation à l'aide de CD40 ligand soluble (sCD40L) permet d'augmenter l'immunogénicité (Kalady, Onaitis et coll. 2004)

Un autre point important dans l'utilisation de DCs en thérapie cellulaire est la voie d'administration à utiliser pour obtenir la meilleure réponse immune possible. Différentes voies ont pu être testées : en intradermique (i.d.), en sous-cutanée (s.c.), en intraveineuse (i.v.), en intranodulaire ou encore en intratumorale (Mullins, Sheasley et coll. 2003). Les injections i.v. permettent une distribution préférentielle dans le foie et à moindre degré dans la rate et le foie. Une injection i.d. induit la colonisation par les DCs des ganglions lymphatiques afférents (Mackensen, Krause et coll. 1999). Malgré une proportion inférieure à 10% des cellules injectées colonisant les ganglions lymphatiques, l'administration en i.d. est plus efficace que les injections en s.c. et i.v. pour l'obtention d'une réponse Th1 anticancéreuse (Schuler, Schuler-Thurner et coll. 2003). L'injection intranodulaire, plus délicate à effectuer, permet de s'affranchir de l'étape de migration. De plus elle semble plus performante que la voie i.d. pour une sensibilisation des T (Bedrosian, Mick et coll. 2003).

## **CHAPITRE III : LES ANTIGENES TUMORAUX.**

Quelque soit la stratégie envisagée dans le développement d'un vaccin antitumoral, la détermination de l'antigène qui sera la cible du système immunitaire est un point essentiel. Il est donc nécessaire de connaître les mécanismes d'oncogenèse et les profils d'expression des antigènes tumoraux.

Les cellules tumorales sont caractérisées par une expression dérégulée de gènes ou des mutations affectant leur fonction. Selon les cas, ces gènes conduisent à une production de protéines anormales, à la surexpression de protéines normales ou encore à l'expression de nouvelles protéines. Le protéasome des cellules cancéreuses va dégrader ces protéines et permettre de présenter des peptides lié au CMH-I à leur surface. Parallèlement, les corps apoptotiques issus des cellules cancéreuses mortes vont être phagocytés par les APC. Des peptides seront présentés par le CMH-II selon la présentation exogène classique et par le CMH-I dans le cas de la présentation croisée. Ces mécanismes d'apprêtement permettront l'initiation de la réponse immune. Trois grandes catégories d'antigènes associés à des tumeurs ou TAAs (Tumor-associated antigens) peuvent être définies en fonction des types de dérégulation et de leur profil d'expression.

### **I. Les antigènes codés par des gènes mutés ou anormalement exprimés.**

La catégorie la plus commune d'antigènes tumoraux correspond à des protéines issues de gènes mutés ou anormalement exprimés. Ces gènes sont classiquement associés à un phénotype « malin ».

#### **I-A. Les antigènes « uniques » codé par des gènes mutés.**

Ces antigènes ont été identifiés au niveau de la séquence de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDK4) (Wolfel, Hauer et coll. 1995), le contrôle de la prolifération ( $\beta$ -caténine) (Robbins, El-Gamil et coll. 1996) ou l'induction de l'apoptose (CASP-8) (Mandrizzato, Brasseur et coll. 1997). Certaines mutations au niveau des produits du proto-oncogène *ras* ou du gène suppresseur de tumeurs *p53* sont reconnues par des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Gedde-Dahl, Eriksen et coll. 1992; Gedde-Dahl, Spurkland et coll. 1992; Theobald, Biggs et coll. 1995; Gjertsen, Buanes et coll. 2001).

D'autres antigènes de cette catégorie sont les protéines virales. En effet, certains virus sont liés à l'apparition de tumeurs. Le papilloma virus humain (HPV) peut être impliqué dans le cancer du col de l'utérus (protéines E6 et E7) (Tindle 1996), le virus d'Epstein Barr (EBV) dans les lymphomes (protéines BARF0, LMP2) (Khanna, Burrows et coll. 1998; Roskrow, Suzuki et coll. 1998) ou encore le virus de l'hépatite B dans les tumeurs hépatiques. Ces antigènes associés aux tumeurs issus de mutations ou d'origine virale pourraient être des candidats intéressants pour l'immunothérapie. Cependant, la mise en place d'un tel traitement doit être faite au cas-par-cas et nécessite d'identifier la protéine mutée l'antigène viral au niveau de la tumeur de chaque individu. Le développement d'un vaccin antitumoral à grande échelle n'est donc pas envisageable dans ce contexte.

### **I-B. Les antigènes non mutés surexprimés.**

Ces antigènes ubiquitaires sont surexprimés spécifiquement dans un nombre important de cellules tumorales d'origines variées. Ils sont produits dans les cellules normales à des niveaux particulièrement faibles, dits « cryptiques ». Pour cette raison, les CTL spécifiques de ces antigènes reconnaissent les cellules tumorales mais pas les cellules saines. En effet, un seuil d'expression minimal de l'antigène semble être nécessaire pour la reconnaissance par les CTL (Lethe, van der Bruggen et coll. 1997). Un antigène typique de cette catégorie est la protéine HER-2/neu dont le gène est exprimé dans les tissus normaux et surexprimé dans environ 30% des cancers du sein et de l'ovaire (Pauletti, Godolphin et coll. 1996; Press, Bernstein et coll. 1997). Récemment, des antigènes ont été identifiés, par une approche prédictive. Notamment la sous-unité catalytique hTERT de la télomérase se trouve surexprimée dans plus de 85% des cancers (Vonderheide, Hahn et coll. 1999; Ayyoub, Migliaccio et coll. 2001). Des résultats précliniques intéressants permettent d'envisager pour cette catégorie d'antigènes, une immunothérapie contre de nombreux types de cancers d'origines histologiques variées (Nair, Heiser et coll. 2000). L'expression ubiquitaire de ces antigènes nécessite cependant une étude attentive de l'induction de réactions auto-immunes.

## **II. Les antigènes tumeur-spécifiques.**

Cette catégorie d'antigènes se caractérise par une expression restreinte à un contexte tumoral. Ces marqueurs « parfaits » d'atteinte tumorale restent cependant rares et les plus connus sont ceux de la famille MAGE : MAGE (Melanoma-associated antigen) 1, 2 et 3 (van der Bruggen, Traversari et coll. 1991), BAGE (B melanoma antigen) (Boel,

Wildmann et coll. 1995), GAGE (G antigen) (Van den Eynde, Peeters et coll. 1995), RAGE (Renal tumor antigen). La plupart des antigènes MAGE ont été décrits initialement dans les cancer à mélanome mais de nombreux types de tumeurs d'origines histologiques variées les expriment également. C'est le cas pour les carcinomes de la zone tête/cou, les carcinomes hépatiques et mammaires. Par exemple, 48% des mélanomes et 80% des carcinomes hépatiques expriment MAGE-1 (Van den Eynde et van der Bruggen 1997). Ils ne se trouvent pas dans les tissus sains à l'exception des cellules germinales testiculaires ou de la rétine. Cette expression spécifique des gènes MAGE pourrait être liée à une hypométhylation de l'ADN génomique (Weber, Salgaller et coll. 1994).

De par leur expression dans un nombre important de tumeurs d'origines variées, ces antigènes sont des candidats privilégiés pour l'immunothérapie antitumorale. Leur expression constitutive dans les testicules et la rétine n'est pas gênante puisque, n'exprimant pas ou peu de molécules du CMH, ces cellules ne peuvent pas présenter les épitopes de MAGE au système immunitaire.

### **III. Les antigènes de différenciation.**

La plupart de ces antigènes ont été décrits dans les mélanomes. Ils correspondent à la réexpression d'une protéine caractéristique d'un stade plus précoce de la différenciation cellulaire. Au cours du développement embryonnaire, les cellules neuroectodermiques qui se différencient en mélanocytes expriment de nouvelles protéines. Leur expression va s'éteindre durant les étapes successives de différenciation vers les mélanocytes matures. Dans le cas du mélanome, on constate une augmentation ou une production anormale de ces protéines de la lignée mélanocytaire, et la mise en place d'une réponse cellulaire cytotoxique anti-mélanome dirigée contre certains de leurs épitopes. Les protéines MART-1/Melan-A (Kawakami, Eliyahu et coll. 1994; Castelli, Storkus et coll. 1995), gp100 (Kawakami, Eliyahu et coll. 1995), tyrosinase (Topalian, Rivoltini et coll. 1994), ou encore TRP-1 et TRP-2 (Wang, Appella et coll. 1996) font partie de ces antigènes spécifiques. La réponse immune déclenchée peut affecter des mélanocytes sains et engendrer une décoloration de la peau (Duhra et Ilchyshyn 1991; Anichini, Maccalli et coll. 1993; Kawakami, Eliyahu et coll. 1994; Kawakami, Eliyahu et coll. 1995). Cette réponse auto-immune associée à la présence de CTLs réactifs chez des individus sains témoigne d'un mécanisme de rupture de la tolérance périphérique (van Elsas, van der Burg et coll. 1996; Pittet, Valmori et coll. 1999). En absence de pathologie, ces protéines sont exprimées de façon cryptique (non présentées au système immunitaire ou présentées en absence de costimulation) et induisent une tolérance périphérique par anergie des lymphocytes T réactifs. Lors de leur



surexpression, une présentation associée aux molécules de costimulation conduit à une activation, ou à la ré-activation, des cellules T et à la mise en place de la réponse immune. Les effets auto-immuns observés se limitent à une dépigmentation de la peau, les antigènes de cette catégorie sont particulièrement intéressants pour une immunothérapie du mélanome. Par conséquent, divers essais cliniques de stratégie vaccinale sont menés sur ce modèle (Jaeger, Bernhard et coll. 1996; Rosenberg, Yang et coll. 1998; Rosenberg, Zhai et coll. 1998; Scheibenbogen, Schmittel et coll. 2000). D'autres antigènes lignée-spécifiques ont également été décrits dans les cancers de la prostate comme le PSA (prostate-specific membrane antigen), le PAP (prostatic alkaline phosphatase) ou encore le PSMA (prostate-specific membrane antigen) (Correale, Walmsley et coll. 1997; Ghosh et Heston 2004).

# **CHAPITRE IV : IMMUNOTHÉRAPIE CELLULAIRE ET VACCINATION GÉNIQUE ANTI-CANCÉREUSE.**

## **I. Thérapie cellulaire.**

Une fois effectuée la production en grande quantité de DCs et l'identification de TAAs potentiellement intéressants, reste à réaliser le chargement des DCs avec les Ag.

### **I-A. Chargement exogène.**

On peut distinguer le chargement nécessitant une étape d'internalisation (endocytose, phagocytose) de l'antigène de celui qui consiste à fixer des peptides antigéniques agonistes des molécules du CMH à la surface des DCs.

Dans le premier cas, la présentation des déterminants antigéniques s'effectuera sur les molécules du CMH-II par la voie exogène classique et *via* celles du CMH-I grâce aux propriétés de présentation croisée des DCs. La voie de présentation classique sur les molécules de CMH-I des antigènes endogènes ne peut être pas sollicitée. Dans le deuxième cas, la présentation antigénique sera restreinte au CMH présents à la surface des APCs pour lequel l'épitope peptidique a été optimisé.

#### **1. Les corps apoptotiques.**

Des corps apoptotiques de cellules tumorales autologues sont phagocytés par les DCs. (Albert, Darnell et coll. 1998; Albert, Pearce et coll. 1998; Jenne, Arrighi et coll. 2000). Les épitopes antigéniques résultant de leur dégradation sont présentés selon la voie du CMH-II et la présentation croisée. Il y a donc dans ce cas une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, tous deux nécessaires pour une réponse antitumorale efficace. Cependant, cette approche présente des contraintes. Il s'agit ici d'une approche à visée thérapeutique puisque l'obtention des corps apoptotiques nécessite une biopsie de la tumeur établie.

#### **2. Les exosomes.**

Les exosomes sont de petites vésicules de 50 à 100 nm de diamètre, sécrétées par de nombreux types cellulaires, tels que les hématies, les lymphocytes B et T cytotoxiques, les mastocytes, les plaquettes, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules tumorales et les DCs immatures (Zitvogel, Regnault et coll. 1998; Thery, Boussac et coll. 2001). Les exosomes dérivants de DCs ou DEXs (DC-derived exosomes) sont riches en

molécules du CMH-I et CMH-II, ainsi qu'en molécules de costimulation. La stratégie de chargement des DCs matures avec ces exosomes permet l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les exosomes dérivés de tumeur ou TEXs (Tumor-derived exosomes) peuvent également être utilisés pour charger des DCs matures. Riches en TAAs, ils peuvent induire une réponse cellulaire efficace contre la tumeur d'origine grâce à la voie de présentation croisée (Chaput, Taieb et coll. 2005). Cependant, il s'agit également d'une approche thérapeutique et l'utilisation des TEXs nécessite une biopsie de la tumeur.

### **3. Les protéines antigéniques.**

Les protéines antigéniques entières sous forme soluble peuvent être utilisées (Paglia, Chiodoni et coll. 1996). Cette stratégie permet de présenter au système immunitaire tous les déterminants antigéniques possibles d'un TAA donné. Malgré les propriétés de présentation croisée des DCs, la voie principale de présentation des protéines exogènes reste celle du CMH-II. Ce sont donc des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui seront majoritairement stimulés, produisant d'importantes quantités d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , au détriment d'une stimulation nécessaire et efficace des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques.

### **4. Les peptides antigéniques.**

Les DCs peuvent également être chargées ou « pulsées » avec des peptides synthétiques (Celluzzi, Mayordomo et coll. 1996) ou naturels (Zitvogel, Mayordomo et coll. 1996) dérivant de TAAs connus. Ce mode de chargement est le plus utilisé dans les essais cliniques. On retrouve des peptides dérivés de MUC1, Her-2/neu, la survivine, la télomérase, le CEA (carcinoembryogénic antigen), p53, MAGE et Melan-A/MART1. Le choix des épitopes est déterminé par leur immunogénicité et leur capacité de liaison au CMH-I (essentiellement HLA-A2) ou CMH-II. De nombreux peptides sont actuellement commercialisés et utilisables en clinique. Cependant, l'inconvénient majeur rencontré dans cette approche concerne la restriction allélique. En effet, les peptides sont optimisés pour un seul type allélique du CMH et leur efficacité devient moindre, voire nulle, dans un contexte allélique différent. De plus, l'utilisation de peptides agonistes du CMH-I ne permet pas de stimuler les lymphocytes Th qui reconnaissent le CMH-II et dont le rôle dans l'initiation et le maintien de la réponse antitumorale est essentiel. Un second problème se situe dans le risque d'échappement des cellules tumorales. La restriction des épitopes déclenchant la réponse antitumorale, et donc des clones lymphocytaires activés, augmente le risque d'échappement dans le cas d'une diminution de l'expression de l'antigène par les cellules tumorales. Enfin, la quantité de peptides antigéniques exposés à la surface des DCs et de leur durée de vie, souvent faible, sont des paramètres limitant l'obtention d'une présentation antigénique optimale *in vivo* (van der Burg, Visseren et coll. 1996).

Le Tableau 2 donne quelques exemples d'essais cliniques réalisés avec ce type de chargement des DCs.

**Tableau 2 : *Essais cliniques en immunothérapie cellulaire anti-cancéreuse par transfert de DCs chargées en antigènes de façon exogène.***

Type de cancer	Antigènes	Type de DCs	Voie d'administration	Nombre de patients	Référence
Leucémie	Corps apoptotiques	MaMo	i.v.	4	(Fujii, Shimizu et coll. 2001)
			i.d.	9	(Hus, Rolinski et coll. 2005)
Lymphome cutané à cellules T	Lysat cellulaire	MaMo	i.n.	10	(Maier, Tun-Kyi et coll. 2003)
Mélanome (stade IV)	MAGE 3 Melan A/MART 1 gp100 et/ou lysat cellulaire	MaMo	s.c. (+ IL-2 + Temozolomide)	2	(Andersen, Keikavoussi et coll. 2001)
Mélanome	Lysat cellulaire + KLH	ImMo	i.d.	14	(Chang, Redman et coll. 2002)
Mélanome métastatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.d.	19	(O'Rourke, Johnson et coll. 2003)
Mélanome métastatique	MART, Tyrosinase, gp100 et influenza matrix ou Lysat cellulaire + KLH	ImMo	i.n.	33	(Hersey, Menzies et coll. 2004)
Mélanome métastatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.d.	10	(Nagayama, Sato et coll. 2003)
Mélanome métastatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.d.	17	(Chakraborty, Sporn et coll. 1998)
Mélanome métastatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.n.	11	(Vilella, Benitez et coll. 2004)
Cancer ovarien (Progressif ou récurrent)	Lysat cellulaire	MaMo	s.c./ i.d.	6	(Murphy, Tjoa et coll. 1996)
Carcinome rénal métastatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.d.	5	(Pandha, John et coll. 2004)
Cancer médullo-thyroïdien	Lysat cellulaire	MaMo	i.n.	10	(Stift, Sachet et coll. 2004)
Cancer hépatique	Lysat cellulaire	MaMo	i.n.	10	(Rains, Cannan et coll. 2001)

Type de cancer	Antigènes	Type de DCs	Voie d'administration	Nombre de patients	Référence
Cancer du Pancréas (Neuroendocrine)	Lysat cellulaire	MaMo	s.c.	1	(Schott, Feldkamp et coll. 2001)
Gliome	Lysat cellulaire + KLH	ImMo	i.d.	0	(Yamanaka, Abe et coll. 2003)
Gliome	Lysat cellulaire	MaMo	s.c.	14	(Yu, Liu et coll. 2004)
Gliome	Lysat cellulaire	MaMo	i.d. ou i.d./i.t	24	(Yajima, Yamanaka et coll. 2005)
Neuroblastoma	Lysat cellulaire + KLH	BDC	i.v. (& IL-2)	12	(Morisaki, Matsumoto et coll. 2003)
Mélanome (Pretraité Stade IV)	Lysat ou mélange + KLH peptide (HLA-A1: MAGE1/MAGE3; HLA-A2: Melan A, tyrosinase, gp100)	ImMo (+FCS)	i.n.	16	(Nestle, Alijagic et coll. 1998)
Mélanome (stade IV)	Peptide MAGE 3A1 (HLA-A1)	MaMo	s.c., i.d. puis i.v.	11	(Turner, Haendle et coll. 1999)
Mélanome (métastatique)	Peptides Mart-1; gp 100	ImMo	i.v. ( $\pm$ IL-2)	10	(Panelli, Wunderlich et coll. 2000)
Mélanome (stade IV)	Peptide MAGE-1, MAGE-3 (HLA-A1), Melan A, gp100, Tyrosinase (HLA-A2)	CD34+	i.v.	14	(Mackensen, Herbst et coll. 2000)
Mélanome (stade IV)	Peptides MAGE 3 (HLA-A1 or HLA A2)	MaMo	s.c. puis i.v.	8	(Schuler-Thurner, Dieckmann et coll. 2000)
Mélanome (stade IV)	Peptides Mart-1, Tyrosinase, gp100	ImMo	i.v.	16	(Lau, Wang et coll. 2001)
Mélanome (stade IV)	Peptides Melan A ou MAGE-1	ImMo v	i.n.	11	(Jonuleit, Giesecke-Tuettenberg et coll. 2001)
		MaMo			
Mélanome métastatique	Peptides Gp 100 et tyrosinase	ImMo	i.v. / s.c.	23	(Slingluff, Petroni et coll. 2003)
Mélanome métastatique	Peptides Mélanome Class I/II + KLH	MaMo	i.d.	24	(Hersey, Menzies et coll. 2004)
Mélanome métastatique	Peptides Class I (MART, gp100, tyrosinase)	MoDC avec calcium ionophore, IL2 et IL12	i.v.	27	(Bedrosian, Mick et coll. 2003)
			i.n.		
			s.c.		

Type de cancer	Antigènes	Type de DCs	Voie d'administration	Nombre de patients	Référence
Cancer du sein métastatique	Peptide antigénique	MaMo	i.v.	1/11	(Yamaguchi, Ohta et coll. 2005)
Cancer du sein	Peptide CEA (CAP-1)	MaMo	i.v.	5/21	(Morse, Deng et coll. 1999)
Cancer du sein métastatique	peptide HLA-A2 restreint hTERT + KLH	MaMo	s.c.	2	(Dees, McKinnon et coll. 2004)
Cancer du sein métastatique	Peptide p53	MaMo	s.c.	6/9	(Svane, Pedersen et coll. 2004)
Cancer ovarien	Peptide CEA (CAP1)	MaMo	i.v.	3/21	(Hernando, Park et coll. 2002)
Cancer ovarien (stade II)	Peptides Her 2/Neu ou MUC-1	MaMo	s.c.	3/10	(Brossart, Wirths et coll. 2000)
Cancer de la prostate	mPAP	BDC	i.v., s.c.	13	(Burch, Breen et coll. 2000)
			s.c., GM-CSF Ag		
Cancer de la prostate	rPSA	MaMo	i.v.	127	(Lee 2003)
Cancer de l'oesophage	Peptide MAGE	MaMo	s.c.	7	(Sadanaga, Nagashima et coll. 2001)
Cancer gastrique	Peptide MAGE	ImMo	i.v.	3	(Kono, Takahashi et coll. 2002)
Cancer gastrique (métastatique)	Peptide Her-2/neu HLA-A2	ImMo	i.v.	6	
Cancer gastrointestinal	Peptide CEA HLA-A24 restreint	BDC	i.d. / s.c.	8	(Itoh, Ueda et coll. 2002)
Cancer colorectal	Peptide MAGE	ImMo	i.d. / s.c.	13	(Hirschowitz, Foody et coll. 2004)
Cancer du poumon	Peptide CEA HLA-A24 restreint	BDC	i.d./ s.c.	2	(Ueda, Itoh et coll. 2004)
Cancer du poumon métastatique	Peptide antigénique	MaMo	i.v.	1/11	(Yamaguchi, Ohta et coll. 2005)
Cancer avancé du pancréas	Peptide ras	ImMo	i.v.	5	(Gjertsen, Bakka et coll. 1996)
Gliome avancé	Peptides	-	s.c.	21/25	(Yajima, Yamanaka et coll. 2005)

Données issues du *Mater Medical Research Institute* (<http://www.mmri.mater.org.au/>).

Abréviations: **ImMo**: DCs immatures dérivées de monocytes, **MaMo**: DCs matures dérivées de monocytes, **BDC**: DCs isolées du sang, **KLH**: Keyhole Limpet Hemocyanine (adjuvant), **i.d.**: injection intradermique, **i.n.**: injection intranodulaire, **i.v.**: injection intraveineuse, **i.t.**: injection intratumorale, **s.c.**: injection sous-cutanée

## **I-B. Chargement endogène.**

Les approches par transfert dans les DCs d'acides nucléiques (A.N.), ADN ou ARN, qui codent un TAA permettent l'expression *in cellulo* de la protéine antigénique. Celle-ci dans sa forme native est ainsi dégradée par l'immunoprotéasome et tous les déterminants antigéniques possibles seront apprêtés. On lève aussi la restriction allélique du CMH et du répertoire des clones T réactifs. On prolonge aussi le temps et la quantité de peptides exposés. La mise au point de DCs ainsi génétiquement modifiées permettra d'activer une forte réponse antitumorale et de surpasser la tolérance périphérique établie dans le cas d'antigènes du soi surexprimés (Liu 1998; Nair 1998). Cependant, les A.N. pénètrent très difficilement dans les cellules et sont facilement dégradés par les nucléases. De nombreuses méthodes virales et non virales ont été testées afin d'augmenter leur pénétration.

### **1. Vecteurs viraux.**

#### **1.1 Les virus de la vaccine (VV).**

Les souches atténuées de VV permettent une haute efficacité de transduction des DCs pour de faibles taux de particules virales par cellule (MOIs) : 60% de transduction des DCs pour une MOI de 2,5 de. De plus aucune expression des gènes viraux tardifs n'a été observée (Gunter, Khan et coll. 1993; Jenne, Hauser et coll. 2000). Cependant, les VV sont toxiques pour les DCs modifiées (Jenne, Hauser et coll. 2000) et les DCs immatures infectées perdent leur capacité de maturation *in vitro* (Engelmayer, Larsson et coll. 1999).

#### **1.2 Les Herpes virus (HSV).**

Les vecteurs viraux issus du virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) sont très peu utilisés pour la transduction des DCs humaines. Ils sont fortement toxiques pour les DCs immatures (Kruse, Rosorius et coll. 2000), affectent leur fonctions cellulaires et leur font perdre la capacité de maturation *in vitro* (Salio, Cella et coll. 1999).

#### **1.3 Les virus associés aux adénovirus (AAV).**

Les AAV ont été les premiers mis en avant pour le transfert de gènes dans les DCs. Ils ont un tropisme particulier pour les DCs immatures. Ils pénètrent dans ces cellules après reconnaissance de l'intégrine  $\alpha\beta 5$ . Toutefois une MOI très élevée est nécessaire pour la transduction des DCs, on observe plus de 90% de DCs immatures transduites en utilisant une MOI de 100. Ces fortes doses infectieuses ne semblent pas affecter les fonctions

immunologiques des DCs, mais réduisent leur viabilité (Zhong, Granelli-Piperno et coll. 1999; Gruber, Kan-Mitchell et coll. 2000).

#### **1.4 Les Rétrovirus et Lentivirus (LV).**

Dans la famille des Retroviridae, les rétrovirus présentent un inconvénient majeur. En effet, leur mécanisme de réplication ne leur permet pas d'infecter des cellules quiescentes. Leur utilisation est cependant possible au niveau des précurseurs CD34+ servant à la génération des DCs *in vitro*. Leur efficacité de transduction est alors de 10 à 20%, et les précurseurs modifiés gardent leur capacité de différenciation (Bello-Fernandez, Matyash et coll. 1997; Szabolcs, Gallardo et coll. 1997). Les Lentivirus (LVs) sont eux capables d'infecter des cellules ne se divisant pas. De plus, les LVs tels que le VIH (virus d'immunodéficience humaine) ou le VIS (virus d'immunodéficience simienne) ont un tropisme naturel pour les DCs. Avec une MOI de 50, des vecteurs dérivant du VIH peuvent transduire 50% des DCs immatures. Ces DCs modifiées gardent leur capacité de maturation, restent phénotypiquement identiques aux DCs non modifiées et leur viabilité n'est pas affectée (Gruber, Kan-Mitchell et coll. 2000).

Quelque soit le type de virus utilisé pour infecter les DCs, deux problèmes essentiels de sécurité sanitaire restent récurrents. Le premier est le risque d'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Il a été montré dans d'autres types cellulaires qu'il peut engendrer l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Gunter, Khan et coll. 1993; Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et coll. 2003). Le second est le développement indésirable d'une réponse antivirale par la présentation d'antigènes du vecteur à la surface des DCs infectées. Cette réponse pouvant conduire à des maladies auto-immunes comme des hépatites E1-induites (Yang, Ertl et coll. 1994; Yang, Nunes et coll. 1994). Aussi, bien que les vecteurs viraux tiennent jusqu'à présent une place importante dans les essais cliniques en thérapie génique, ils sont peu utilisés en immunothérapie cellulaire (Tableau 3). Des vecteurs synthétiques, non immunogènes et dont la synthèse est parfaitement contrôlée, sont s'affichent comme une alternative à une vectorologie virale lourde et dangereuse.



**Tableau 3 : Essais cliniques impliquant des vecteurs viraux en immunothérapie cellulaire anti-cancéreuse par transfert de DCs.**

Type de cancer	Vecteur	Voie d'admission	Phase clinique	Investigateur Etablissement référent
Cancer colorectal	fowlpox-CEA-MUC-1-TRICOM +/- GM-CSF	s.c. et i.d.	II	Michael A. Morse, MD Duke University
Cancers solides (sein, prostate, poumon, colon)	fowlpox-CEA-TRICOM vaccine + toxine diphtérique	s.c. et i.d.	II	Michael A. Morse, MD Duke University
Cancer du poumon	Chimiothérapie + adenovirus p53	s.c. et i.d.	I/II	Scott Antonia, MD H. Lee Moffitt , PhD Cancer Center and Research Institute
Cancers solides métastatiques avancés	fowlpox-CEA-TRICOM+ peptide CMV pp65 + toxine tétanique	s.c. et i.d.	I	Herbert Kim Lysterly, MD Duke University
Cancer du sein (stade II et III)	Chimiothérapie + adenovirus p53	s.c.	I/II	Elizabeth C. Reed, MD University of Nebraska

Données issues de l'U.S National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>)

Abréviations: **i.d.**: injection intradermique, **s.c.**: injection sous-cutanée

## **2. Méthodes physiques.**

### **2.1 L'électroporation.**

L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique sur des DCs mises en présence d'A.N. nus pour déstabiliser la membrane plasmique et permettre l'internalisation des A.N. C'est une méthode très efficace pour le transfert de gène dans les DCs (Van Tendeloo, Ponsaerts et coll. 2001; Kalady, Onaitis et coll. 2002; Van Meirvenne, Straetman et coll. 2002; Grunebach, Muller et coll. 2003), ou leurs précurseurs hématopoïétiques (Van Tendeloo, Snoeck et coll. 1998; Van Tendeloo, Willems et coll. 2000). Appliquée au transfert d'ARNm, elle permet une expression du transgène comparable à celle obtenue par transduction de CD34+ avec des rétrovirus ou des Mo-DCs avec des adénovirus (Lundqvist, Noffz et coll. 2002).

La performance et la fiabilité de l'électroporation a conduit au développement de stratégies de criblage d'épitopes antigéniques par transfert d'ARNm différentiels. Cette technique a été éprouvée dans le cas des infections à cytomégalovirus (CMV) (Britten, Meyer et coll. 2005) et des tumeurs stromales (Fassnacht, Lee et coll. 2005) chez l'homme, ou encore du virus de la peste porcine (CSFV) chez le porc (Ceppi, de Bruin et coll. 2005). Les approches cliniques sont toutes aussi performantes avec la mise en place de stratégies

haut-débit pour la culture et le transfert de gènes (Mu, Lazarova et coll. 2004; Ueno, Tcherepanova et coll. 2004) et de nombreux essais sont menés depuis les 5 dernières années (Tableau 4).

**Tableau 4 : *Essais cliniques en immunothérapie cellulaire anti-cancéreuse par transfert de DCs chargées par électroporation avec des ARNm.***

Type de cancer	Antigène	Voie d'administration	Phase clinique	Investigateur
Prostate (métastatique)	ARNm PSA	-	I	(Heiser, Coleman et coll. 2002)
Colon (métastatique)	ARN tumoral total autologue	-	I	(Nair, Morse et coll. 2002)
Cancer + Colon (métastatique) exprimant le CEA	ARNm CEA	i.v.	I/II	(Morse, Nair et coll. 2003)
Prostate	ARNm tumoral total allogénique	i.n. et i.d.	I	(Mu, Kyte et coll. 2005)
Melanome	ARNm tumoral total autologue	i.d. ou i.n.	I/II	(Kyte, Mu et coll. 2006)
Prostate (métastatique)	ARNm hTERT ou hTERT-LAMP1	i.d.	I	(Su, Dannull et coll. 2005)
Rein	ARN tumoral total	i.v. et i.d.	I	(Su, Dannull et coll. 2003)
Neuroblastome métastatique	ARN tumoral total	i.d. ou i.v.	I	(Caruso, Orme et coll. 2005)
Tumeur cérébrale	ARN tumoral total	i.v. et i.d.	I	(Caruso, Orme et coll. 2004)

Données issues de l'U.S National Institutes of Health (<http://clinicaltrials.gov/ct/gui>) et National Library of Medicine (NLM, <http://www.nlm.nih.gov/>). Abréviations: **i.d.** : injection intradermique, **i.n.**: injection intranodulaire, **i.v.** : injection intraveineuse

## **2.2 Le bombardement de gène ou « gene gun ».**

Cette méthode utilise des particules d'or de très faible taille (~ 2µm) ayant de l'ADN plasmidique adsorbé à leur surface. Ces particules recouvertes sont ensuite propulsées sur des DCs en culture afin d'y être internalisées (Tuting, Wilson et coll. 1998). Cette technique

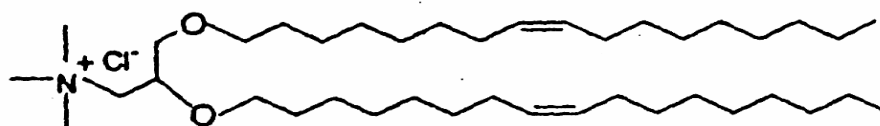
permet l'obtention de DCs transfectées transitoirement et capables d'induire une stimulation des cellules T autologues.

### **3. Méthodes chimiques.**

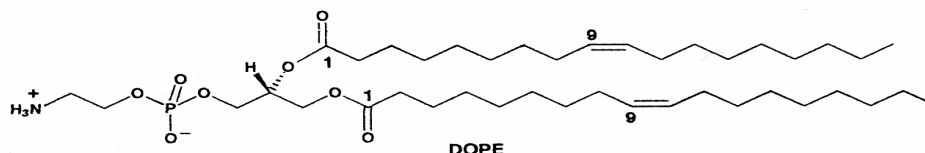
Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques que rien ne prédispose à traverser une membrane cellulaire présentant de nombreuses charges négatives. Ce problème peut être résolu en les compactant grâce à des molécules polycationiques. Le complexe ainsi formé protège également de la dégradation par les nucléases. Pour qu'il soit internalisé spécifiquement, le vecteur peut contenir un signal reconnu par des récepteurs spécifiques capables d'induire une endocytose. De plus, le vecteur doit posséder un signal de translocation cytosolique permettant de franchir la membrane plasmique et/ou celle des vésicules d'endocytose pour délivrer l'A.N. dans le cytosol. Dans le cas d'un ADN, un signal de localisation nucléaire (NLS) porté par le plasmide peut être ajouté pour favoriser la pénétration de celui-ci dans le noyau cellulaire. Une fois le plasmide dans le compartiment nucléaire, il est possible de favoriser l'expression du gène en utilisant des promoteurs ou des enhanceurs particuliers. Dans le cas d'un ARN messager, la traduction se faisant dans le cytosol, il n'est pas nécessaire d'avoir un NLS. Les vecteurs chimiques sont de deux types :

#### **3.1 Les lipides cationiques.**

Ils ont été développés pour la première fois par Felgner en 1987 avec le DOTMA (1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium) (Felgner, Gadek et coll. 1987). Les lipides cationiques sont utilisés sous forme de liposomes et sont généralement associés avec un co-lipide neutre qui peut avoir des propriétés fusiogènes (DOPE) vis à vis des membranes cellulaires ou de stabilisation des liposomes (cholestérol). Par exemple, la Lipofectine est une solution de liposomes cationiques constituée de DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) et de DOTMA dans un rapport massique 1 : 1 (Figure 15).



Chlorure de N-[1-(2,3-Dioléoyloxy)propyl]-N,N,N triméthylammonium



Dioléoyl L- $\alpha$ -phosphatidyléthanolamine

Figure 15: Formule chimique du DOTMA et du DOPE.

Les A.N. en solution réagissent spontanément avec les liposomes cationiques pour former des complexes A.N./liposomes cationiques (lipoplexes) capables de transférer de façon stable ou transitoire différents types cellulaires. Ces complexes ont des tailles comprises entre 300 et 500 nm. A ce jour, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés. Une liste non exhaustive est donnée dans le Tableau 5.

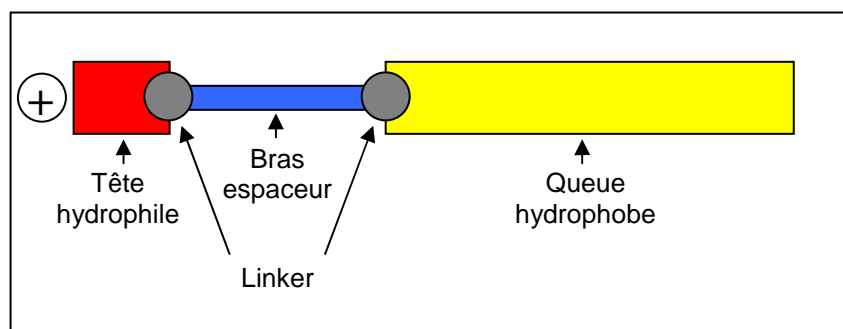
Tableau 5: Lipides cationiques.

Abréviation	Nom
DODAB	Bromure de dioctadecyldiméthylammonium
DOTMA	Chlorure de N-[1-(2,3-Dioléoyloxy)propyle]-N,N,N-triméthylammonium
DOTAP	1,2-Dioléoyloxy-3-(triméthylammonio)propane
DMRIE	Bromure de 1,2-Dimyristoyloxypropyle-3-diméthylhydroxyéthylammonium
DOSPA	Acide trifluoroacétique de 2,3-Dioléoyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)éthyle]-N,N-diméthyle-1-propanaminium
GAP-DLRIE	Bromure de ( $\pm$ )-N-(3-aminopropyle)-N,N-diméthyl-2,3-bis(dodecyl oxy)-1-propanaminium
DORI	Bromure de 1,2-Dioléoyloxypropyle-3-diméthylhydroxyéthylammonium
EDMPC	Chlorure de 1,2-Dilauroyle-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
DOGS	Dioctadecylamidoglycospermine
DC-Chol	3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)carbamoyl] cholestérol
BGTC	Bis-guanidinium-tren-cholestérol
DPPES	Dipalmytoylphosphatidyléthanolamidospérmine
ELMPC	Chlorure de 1,2-Dilauroyle-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
EOMPC	Chlorure de 1,2-Dioléoyloxy-sn-glycéro-3-éthylphosphocholine
DODAC	Chlorure de Dioléoyldiméthylammonium
DOTIM	Chlorure de 1-[2-(Oléoyloxy)-éthyle]-2-oléoyloxy-3-(2-hydroxyéthyle)imidazolinium
DOSPER	Acétate de 1,3-Dioléoyloxy-2-(6-carboxyspermyle) propylamide 4

<b>SAINT-n</b>	Une série de dialkyle pyridinium-alkyles halides
<b>GLB43</b>	Phosphonolipide
<b>KLN-5</b>	Lipophosphoramide

*D'après Templeton et Lasic (2000).*

La plupart de ces lipides cationiques sont constitués d'un corps de type glycérol substitué par une partie hydrophobe comportant deux chaînes d'acides gras en C14, C16 ou C18 insaturés ou saturés (Figure 16). La tête hydrophile mono cationique est le plus souvent un ammonium quaternaire qui permet d'interagir avec les charges négatives portées par les phosphates des A.N. D'autres lipides cationiques de type phospholipide tels que les phosphonolipides (GLB43) (Floch, Delepine et coll. 2000) et les lipophosphoramides (KLN-5) (Montier, Delepine et coll. 2004) ont été développés.



**Figure 16 : Structure générale d'un lipide cationique**

Des dérivés cationiques du cholestérols tels que le 3 $\beta$ -[N-(N'',N'-diméthyllaminoéthane) carbanoyl] cholestérol ou DC-Cho (Gao et Huang 1991), le bis-guanidinium-spermine-cholestérol ou BGSC, le bis-guanidinium-trencholestérol ou BGTC et le bis-guanidinium-diacétylène ou BGDA forment également des vecteurs efficaces lorsqu'ils sont associés au DOPE (Vigneron, Oudrhiri et coll. 1996; Pitard, Oudrhiri et coll. 1999; Patel, Vivien et coll. 2001).

Les lipopolyamines sont des lipides multicationiques obtenus par couplage avec de la spermine ou de la polylysine. Les travaux de Behr ont donné la dioctadecyl-amidoglycyl-spermine (DOGS) et la dipalmitoyl-phosphatidyl-éthanolamido-spermine (DPPES) (1989; Demeneix, Abdel-Taweb et coll. 1994). La polylysine de faible degré de polymérisation (20 résidus) substituée par du N-glutaryl-1, 2-dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine, est également efficace pour le transfert de gènes dans les cellules adhérentes (Zhou, Klibanov et coll. 1991). Cependant, les lipopolyamines sont assez cytotoxiques à des concentrations élevées (Staedel, Remy et coll. 1994). Dans le Tableau 6, sont regroupés un certain nombre de liposomes cationiques commercialisés.

**Tableau 6: Liposomes cationiques commercialisés.**

Nom	Composition	Distributeur
<b>Lipofectine</b>	DOTMA:DOPE 1/1 m/m	Gibco BRL
<b>DOTAP</b>	DOTAP	Roche
<b>LipofectAMINE</b>	DOSPA:DOPE 3/1 m/m	Gibco BRL
<b>LipofectAMINE PLUS</b>	LipofectAMINE:PLUS reagent 3/2 v/v	Gibco BRL
<b>CLONfectine</b>	Dimiristoyle-amidine	Clontech
<b>DMRIE-C</b>	DMRIE:Cho 1/1 M/M	Gibco BRL
<b>Transfectame</b>	DOGS	ProMega
<b>LipofectAce</b>	DODAB:DOPE 0,5/5 m/m	Gibco BRL
<b>DC-Chol</b>	DC-Chol:DOPE 3/2 m/m	Sigma
<b>DOTAP:Chol</b>	DOTAP:Chol 1/1 m/m	Sigma
<b>Transfectall</b>	Cholestéryl-spermidine	Apollon
<b>CLONfectine</b>	Dimiristoyle-amidine	Clontech
<b>TransFast</b>	(+)-N,N [bis (2-hydroxyethyl)]-N-methyl-N- [2,3-di(tetradecanoyloxy)propyl] ammonium iodide : DOPE	Promega
<b>DAC-30</b>	3beta-[N-(N,N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]-cholesterol (DAC-Chol) : DOPE	Eurogentec
<b>Tfx-50</b>	[N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-di(oleoyloxy)-1,4-butanediammonium iodide] : DOPE	Promega
<b>GenePORTER</b>	GenePORTER reagent : DOPE	Galentis-Gene Therapy Systems

*D'après Templeton et Lasic, 2000 (Lasic 2000), Rughetti A. (Rughetti, Biffoni et coll. 2000) et Strobel I. (Strobel, Berchtold et coll. 2000)*

Les premiers travaux témoignant de l'utilisation de lipides cationiques pour le transfert d'ADN plasmidique dans les DCs ont été publiés en 1994 par Rouse et coll. avec l'utilisation du DOTAP (1994). Ces travaux portant sur l'*Herpes virus* (HSV) montrent que le transfert de l'ADN plasmique codant la glycoprotéine B ou l'ICP27 dans les DCs permet une réponse

cellulaire antigène-spécifique *in vitro*. Dans le modèle du mélanome, la Lipofectine a permis une expression suffisante du transgène MART1 ou de la tyrosinase dans les DCs humaines pour stimuler des cellules T CD8<sup>+</sup> et induire une réponse CTL antitumorale *in vitro* (Alijagic, Moller et coll. 1995; Philip, Brunette et coll. 1998). Dans une approche *in vivo*, Yang et coll. (1999) montrent chez la souris l'induction d'une réponse cellulaire CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique après réinjection de DCs transfectées par l'ADN codant la gp100 à l'aide de Lipofectine. Des résultats encourageants ont également été obtenus avec ce vecteur pour le transfert de l'ADN plasmidique codant pour l'antigène MUC1. Pecher et coll. (2001) ont en effet rapporté que des DCs transfectées à l'aide de Lipofectine étaient aussi efficaces que les DCs transduites par des adénovirus recombinants pour la stimulation *in vitro* de lymphocytes autologues circulants. La performance de cette approche a pu être confirmée par la suite *in vivo* au cours d'un essai clinique de phase I/II (Pecher, Haring et coll. 2002).

Afin de déterminer le vecteur lipidique le plus approprié pour le transfert d'ADN plasmidique dans les DCs, Strobel et coll. (2000) ont réalisé des travaux comparatifs portant sur l'efficacité de transfection du TransFast, du DAC-30, du DMRIE-C, du DOTAP, de la LipofectAMINE PLUS, de la Lipofectine, du Tfx-50 et du Gene Porter. Ils ont montré avec des DCs dérivées de monocytes du sang périphérique (PBMCs) que seuls le TransFast et le DAC-30 donnaient des résultats satisfaisants pour le transfert du plasmide codant le gène rapporteur GFP (green-fluorescent protein). Les taux de transfection de 10% sont comparables à ceux obtenus par leur méthode d'électroporation. Ces données montrent également que la lipofection d'un plasmide codant l'antigène M1 du virus de la grippe à l'aide du TransFast conduit à une présentation antigénique efficace.

Rughetti et coll. ont publié en même temps un autre essai comparatif de transfection d'ADN dans des DCs humaines issues de PBMCs avec la DMRIE-C, la LipofectAMINE, la LipofectAMINE PLUS, la Lipofectine, le DOTAP et la CLONfectin (Rughetti, Biffoni et coll. 2000). Il est rapporté une forte toxicité ( $\geq 40\%$ ) de l'ensemble de ces liposomes, en particulier de la CLONfectine et de la Lipofectine. Dans leurs conditions, seuls le DOTAP et la LipofectAMINE PLUS ont donné des résultats satisfaisants au niveau morphologique et phénotypique malgré l'induction d'un stress cellulaire. Ces travaux ont mis en évidence que la lipofection de DCs humaines induit la surexpression de marqueurs de surface tels que CD25, CD83, CD86 et HLA-DR, témoignant d'un état d'activation des DCs transfectées. Les lipides peuvent donc agir comme « adjuvants naturels » en mimant un signal de danger potentiel pour les DCs. Enfin, seule l'utilisation de la LipofectAMINE PLUS a permis d'obtenir un état fonctionnel et une expression du transgène suffisante pour induire une présentation antigénique efficace. Rughetti et coll. ont également montré une efficacité comparable, voire supérieure, du FuGENE 6 (formulation non-liposomale, Roche) pour le transfert d'ADN plasmidique dans les DCs humaines.

Plus récemment, Tan P. et coll (2005) ont étudié l'efficacité de transfection du Tfx-50, de la Lipofectine, de la LipofectAMINE 2000, de l'Effectene (Qiagen), du DOTAP, du FuGENE 6, de l'X-treme Gene Q2 (Roche) et de la CLONfectine. Les résultats confirment une très forte toxicité (50-70%) de ces agents de transfection pour les DCs immatures et matures dérivées de PBMCs, et rapportent un très faible pourcentage de transfection (< 4%). Ici aussi, un effet sur la stimulation allogénique des DCs par les vecteurs lipidiques a été mis en évidence.

Dans le cas du transfert d'ARNm Boczkowski et coll. montrent que les DCs, murines ou humaines, transfectées à l'aide de DMRIE par de l'ARNm tumoral amplifié sont capables d'induire une réponse cytotoxique *in vitro* (Boczkowski, Nair et coll. 2000). D'autres équipes ont préféré l'utilisation du DOTAP pour vectoriser l'ARNm des antigènes hTERT (Su, Vieweg et coll. 2002) et de la survivine (Zeis, Siegel et coll. 2003) dans les DCs humaines. Dans un modèle d'immunothérapie cellulaire chez la souris, Koido et coll. montrent que la lipofection de DCs murine avec l'ARNm MUC1, à l'aide de DOTAP, et leur réinjection induit la mise en place d'une réponse antitumorale antigène-spécifique (Koido, Kashiwaba et coll. 2000). Dans un modèle leucémique murin, le transfert de l'ARNm de la survivine et la réinjection des DCs modifiées induit un effet protecteur à long terme (Zeis, Siegel et coll. 2003).

### **3.2 Les polymères cationiques.**

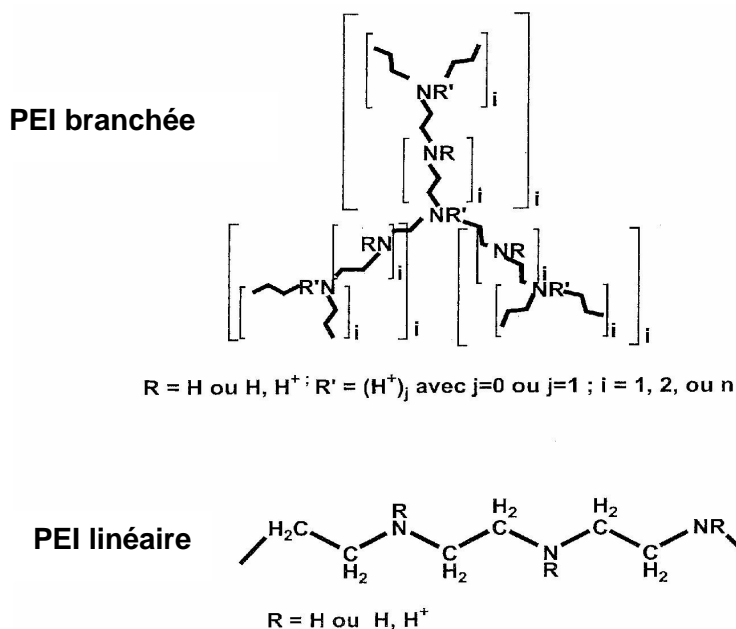
Les polymères cationiques condensent fortement les A.N. et les complexes A.N./ polymères cationiques résultants (polyplexes) sont également capables de transfecter de façon stable ou transitoire différents types cellulaires. Les molécules utilisées comme vecteurs sont la polylysine (pK), la polyéthylèneimine (PEI), les protéines histone, les protéines ou peptides riches en arginine (la protamine ou le peptide TAT du VIH), et les dendrimères cationiques (Brown, Schatzlein et coll. 2001; Thierry, Abes et coll. 2006).

Le polymère cationique le plus couramment utilisé est la polyéthylèneimine (PEI) (Figure 17). Les polyplexes formés sont très efficaces *in vitro* aussi bien dans les cellules adhérentes ou en suspension (Boussif, Lezoualc'h et coll. 1995). L'efficacité de ce polymère tient à ses capacités à condenser l'A.N. et à neutraliser le pH acide des endosomes en piégeant les protons grâce à ses nombreux groupements azotés protonables à pH légèrement acide. Ceci induit une hypertonicité endosomique engendrant la lyse des endosomes et donc la libération de l'A.N. dans le cytosol (Boussif, Lezoualc'h et coll. 1995; Kichler, Leborgne et coll. 2001). L'excès de charges cationiques des polyplexes favorise l'interaction non spécifique avec la membrane cellulaire. Cependant, un trop fort excès de charges cationiques dans les polyplexes induit une toxicité cellulaire importante due à la PEI



libre qui représente 80% de la PEI totale (Clamme, Azoulay et coll. 2003). Différentes tailles de PEI ont été utilisées ainsi que des formes branchées ou linéaires.

**Figure 17: Structure de la PEI**



Tan P. et coll. ont étudié l'efficacité de transfection de la PEI branchée de 25 kDa (Sigma), de la PEI linéaire (ExGen 500, TCS Cellworks) et du SuperFect (Qiagen) (Tan, Beutelspacher et coll. 2005). Les résultats obtenus montrent une très forte toxicité (40-80%) de ces vecteurs pour les DCs immatures et matures dérivées de PBMCs, et un très faible pourcentage de transfection (< 2%).

Bos et coll. se sont également attachés à l'étude du transfert d'ADN plasmidique à l'aide de la PEI et d'autres polymères cationiques dans des DCs lymphoïdes ou myéloïdes de rat : pDMAEMA, pTMAEMA, pDMAEMA-co-NVP, pDMAEMA-co-MAA, pDMAEMA-co-PEG (bloc), pDMAEMA-co-PEG (greffé), pDAMA (Bos, Kanellos et coll. 2004). Après transfection du plasmide codant le gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase, une expression de l'ARNm correspondant a pu être détectée mais aucune activité enzymatique portée par la protéine correspondante n'a pu être mise en évidence. Comme rapporté par Tan P. et coll. avec les DCs humaines, le transfert d'ADN plasmidique dans les DCs de rat induit également une très faible expression protéique. De plus, Bos et coll. montrent que la nature myéloïde ou lymphoïde des DCs influence l'efficacité de transfection des polymères cationiques.

L'utilisation du vecteur cationique non lipidique Transmessenger Transfection Reagent (Qiagen) pour le transfert d'ARNm a permis une transfection de 40-50% des DCs matures et une meilleure présentation antigénique de MART1, en terme de qualité et de

durée, que la technique de chargement peptidique (Liao, Li et coll. 2004). Dans le cas du transfert de l'ARNm de l'antigène RHAMM (Receptor for hyaluronan-mediated motility) dans les DCs murines suivi de leur réinjection permet la mise en place d'une réponse antitumorale (Fukui, Ueno et coll. 2006).

D'autres vecteurs non viraux de type polymère ont été élaborés en tirant partie des fonctions cellulaires des DCs. Ainsi, Diebold et coll. ont utilisé la présence du récepteur mannose à la surface des DCs pour cibler le transfert d'ADN plasmidique en utilisant la PEI mannosylées (ManPEI) (Diebold, Kursa et coll. 1999). La grande capacité de phagocytose des DCs a également été exploitée. Des microparticules cationiques de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) permettant l'adsorption de l'ADN plasmidique à leur surface, ont été utilisées (Denis-Mize, Dupuis et coll. 2000; Jilek, Merkle et coll. 2005). Après internalisation, la plupart des microparticules se concentrent dans les endosomes. L'ADN est relargué dans le compartiment cytosolique et transloqué dans le noyau où il permet l'expression de l'antigène. Les DCs ainsi modifiées permettent *in vitro* une présentation efficace des peptides antigéniques.

Le tableau 7 rappelle l'ensemble des résultats concernant l'utilisation des vecteurs non-viraux pour la transfection *in vitro* des DCs.

**Tableau 7 : Lipides et polymères cationiques utilisés in vitro pour le transfert d'acides nucléiques dans les DCs.**

Vecteur	Nature de l'A.N.	Protéine codée	Origine des DCs	Référence
DAC-30	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
DMRIE-C	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
	ADN	MUC1	humaine	Rughetti et coll. 2002
	ARNm	CEA et tumorales	humaine et murine	Boczkowski et coll. 2000
DOTAP	ADN	gpB et ICP27 de l'HSV	murine	Rouse et coll. 1994
	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
	ADN	MUC1	humaine	Rughetti et coll. 2002
	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
	ARNm	hTERT	humaine	Su et coll. 2002
	ARNm	survivine	murine	Zeis et coll. 2003
	ARNm	MUC1	murine	Koido et coll. 2000
Effectene	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
FuGENE 6	ADN	MUC1	humaine	Rughetti et coll. 2002
	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
Gene Porter	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
LipofectAMINE 2000	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
LipofectAMINE Plus	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
	ADN	MUC1	humaine	Rughetti et coll. 2002
Lipofectine	ADN	MART1 et tyrosinase	humaine	Alijagic et coll. 1995; Philip et coll. 1998
	ADN	gp100	murine	Yang et coll. 1999
	ADN	MUC1	humaine et murine	Pecher et coll. 2001, 2002
	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
				Tan et coll. 2005
	ADN	MUC1	humaine	Rughetti et coll. 2002
Tfx-50	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
				Tan et coll. 2005
TransFast	ADN	GFP	humaine	Strobel et coll. 2000
	ADN	Ag M1 du virus influenza	humaine	Strobel et coll. 2000
X-treme Gene Q2	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
PEI branchée 25 kDa	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
	ADN	béta-galactosidase	rat	Bos et coll. 2004
ExGen 500 (PEI linéaire)	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
SuperFect	ADN	GFP	humaine	Tan et coll. 2005
Transmessenger Transfection Reagent	ARNm	MART-1	humaine	Liao et coll. 2004
	ARNm	RHAMM	murine	Fukui et coll. 2006
ManPEI	ADN	GFP et Ovalbumine	humaine et murine	Diebold et coll. 1999
PLGA	ADN	p55 VIH	murine	Denis-Mize et coll. 2000

## **II. Vaccination génique.**

Il a été montré que l'injection directe d'un plasmide codant un antigène tumoral induit une réponse immune spécifique (Conry, LoBuglio et coll. 1995; Bright, Beames et coll. 1996), et un effet protecteur (Manickan, Kanangat et coll. 1997). De ces premiers travaux est née l'idée d'une immunisation directe par transfert d'ADN contre plusieurs variétés de pathogènes (bactéries, parasites, virus) ou de tumeurs (Gregoriadis 1998; Lewis et Babiuk 1999). En plus de servir de principe actif dans ce type de vaccin, l'ADN plasmidique possède des propriétés immunostimulatrices intrinsèques dues à la présence de motifs CpG (Sato, Roman et coll. 1996; Klinman, Yamshchikov et coll. 1997) qui se lient et activent les Toll-like receptor 9 (TLR9) (Hemmi, Takeuchi et coll. 2000). Cette stimulation des TLR9 conduit à la sécrétion d'IL-6, d'IL-12, de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\alpha$  et - $\gamma$ , et induit la polarisation des T CD4<sup>+</sup> en Th1 (Wagner 1999). Cependant, comme il a été démontré par des expériences sur des modèles de souris invalidées pour ce récepteur (TLR9<sup>-/-</sup>), la présence de CpG n'est pas indispensable à la fonction vaccinale et se limite donc à une fonction d'adjuvant (Spies, Hochrein et coll. 2003). Il a été rapporté que l'ARNm a également une activité d'adjuvant en activant les DCs via les TLR3, TLR7 et TLR8 par ses régions double-brin ou ses séquences riches en GU (Diebold, Kaisho et coll. 2004; Heil, Hemmi et coll. 2004; Kariko, Ni et coll. 2004).

### **II-A. Injection des A.N. nus.**

En 1998, Schreurs et coll. montrent que l'injection de l'ADN nu codant la protéine antigénique gp100 a un effet protecteur vis-à-vis du développement tumoral du mélanome et permet la mise en place d'une réponse cytotoxique spécifique (Schreurs, de Boer et coll. 1998). L'injection du plasmide codant l'antigène MUC1 conduit à la sécrétion d'anticorps spécifiques et prévient en partie d'une invasion métastatique des poumons. Kamata et coll. ont démontré un rôle majeur des cellules NK dans cet effet protecteur (Kamata, Denda-Nagai et coll. 2002). Chez le macaque rhesus, l'immunisation à l'aide d'un plasmide codant le PSA humain (prostate specific antigen) induit une réponse humorale et une réponse cellulaire de type Th1 (Kim, Yang et coll. 2001).

L'immunisation de souris par injection intramusculaire d'un ARNm chimérique codant le rapporteur luciférase et l'antigène CEA (human carcinoembryonic antigen) a permis une réponse humorale spécifiquement dirigée contre l'antigène tumoral (Conry, LoBuglio et coll. 1995). En utilisant l'ARN tumoral total Granstein et coll. ont montré également la mise en place d'une réponse antitumorale chez la souris après une triple injection par voie intradermique (Granstein, Ding et coll. 2000).

Cependant des quantités importantes d'A.N. nu sont nécessaires dans ce type d'approche (1,5 mg chez le macaque rhesus) et une vectorisation efficace permettrait de diminuer les doses injectées tout en augmentant la réponse immune.

## **II-B. Méthodes physiques.**

### **1. Electroporation.**

La peau est la première barrière contre les pathogènes environnants, contient de grande quantité de DCs (cellules de Langerhans) servant de sentinelles au système immunitaire. Une stratégie qui augmente l'efficacité du transfert de gène dans les cellules par voie intradermique, telle que l'électroporation, permet donc de favoriser la transfection des DCs (Somari, Glasspool-Malone et coll. 2000). Nomura et coll. montrent que l'électroporation au niveau du derme d'un ADN plasmidique codant la nucléoprotéine du virus *influenza A* conduit à une réponse CTL spécifique de l'antigène pour lequel il code (Nomura, Nakata et coll. 1996). Les travaux de Drabrick et coll. dans le modèle porcin montrent que les cellules transfectées par électroporation au niveau de la peau sont des DCs, mais que d'autres cellules monocytaires, des adipocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales sont aussi transfectées. Dans le modèle murin, l'électroporation du plasmide codant le super-antigène (sAg) de l'HBV conduit à une réponse plus importante que celle obtenue par son injection i.d. Contrairement à l'injection de la protéine correspondante, qui induit une réponse exclusivement Th2, les auteurs montrent que l'électroporation du gène conduit à la mise en place d'une réponse essentiellement Th1 (Drabick, Glasspool-Malone et coll. 2001). Kalat et coll. démontrent l'électroporation appliquée d'un ADN plasmidique codant un épitope chimérique de la TRP-2 (tyrosinase-related protein-2) a un effet protecteur contre l'invasion pulmonaire et le développement tumoral du mélanome (Kalat, Kupcu et coll. 2002).

### **2. Bombardement de gènes ou « gene gun ».**

En utilisant la technique de « gene gun » sur l'épiderme de souris, il a été démontré que l'efficacité de la présentation antigénique, qui se produit au niveau des ganglions lymphatiques drainant la zone cible, est essentiellement due aux DCs directement transfectées et ayant migrées (Porgador, Irvine et coll. 1998). Dans le cas de l'injection intramusculaire, ces DCs transfectées ne sont pas observables (Boyle et Robinson 2000). Chez l'homme, la transfection des cellules de Langerhans de la couche basale de l'épiderme

à l'aide du plasmide codant l'antigène MART-1 a permis l'activation d'un clone T spécifique (Larregina, Watkins et coll. 2001). Dans le modèle murin du mélanome B16, Steitz et coll. ont montré que l'immunisation à l'aide d'un plasmide chimérique codant la TRP2 permet une protection contre l'invasion métastatique des poumons (Steitz, Britten et coll. 2006). L'efficacité de la réponse immune antitumorale peut être potentialisée par la co-injection de plasmides codant pour des protéines anti-apoptotiques (BCL-xL, BCL-2, XIAP, caspase-9<sup>Neg</sup> ou caspase-8<sup>Neg</sup>). Ces protéines exprimées en même temps que l'antigène augmentent la durée de vie des DCs transfectées et donc la présentation antigénique *in vivo* (Kim, Hung et coll. 2003). Cependant, les travaux récents de Lauterbach et coll. sur l'efficacité de cette technique indiquent que les DCs transfectées seules ne suffisent pas à induire de réponse cellulaire antitumorale (Lauterbach, Gruber et coll. 2006).

Dès 1996, la stratégie du « gene gun » est également appliquée au transfert ARN. Après deux rappels au niveau de l'épiderme de souris, une forte sécrétion d'anticorps dirigés contre l'antigène codé par l'ARN « bombardé » est obtenue (Qiu, Ziegelhoffer et coll. 1996).

## **II-C. Méthodes chimiques.**

U'Ren et coll. ont vectorisé de l'ADN plasmidique à l'aide de liposomes formés de DOTIM et de cholestérol (U'Ren, Kedl et coll. 2006). Ils constatent d'abord que l'injection i.v. permet d'aboutir à une meilleure réponse immune que par les voies i.d. ou i.m. Cette injection induit la production d'IL-12 par les DCs et augmente l'expression de leurs molécules de costimulation ainsi que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. En complexant un plasmide codant l'antigène p55 gag du VIH-1 par une émulsion cationique de MF59/DOTAP, Ott et coll. obtiennent une réponse humorale supérieure à celle induite avec de l'ADN nu, tout en conservant une réponse cellulaire de même ampleur (Ott, Singh et coll. 2002). L'utilisation par Cui et Mumper de nanoparticules à base de chitosan, un polysaccharide cationique, pour vectoriser de l'ADN antigénique permet également la mise en place d'une réponse immune spécifique de l'antigène (Cui et Mumper 2001). Cette équipe a également développé, à partir de cire et de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), des nanoparticules sphériques d'environ 100 nm de diamètre capables d'adsorber de l'ADN plasmidique à leur surface. L'addition d'un lipide endosomolytique, comme le DOPE, ou d'un ligand permettant le ciblage des DCs, tel que le mannane, permettent d'augmenter l'efficacité de la réponse immune après injection par voie sous-cutanée (Cui et Mumper 2002). La présence de récepteurs mannose à la surface des DCs et des macrophages est également exploitée par Kawakami et coll. en développant des liposomes cationiques mannosylés (Kawakami, Sato et coll. 2000). En injection intra-péritonéale ou intramusculaire,

ces lipoplexes mannosylés sont plus efficaces que l'ADN nu pour induire une réponse CTL spécifique (Hattori, Kawakami et coll. 2006)

En 1993, la première injection directe de liposomes (Chol/PC/PS) contenant l'ARNm d'un antigène viral est rapportée par Martinon et coll (1993). L'ARNm codant la nucleoprotéine (NP) du virus de la grippe permet l'obtention d'une réponse cellulaire cytotoxique. Zhou *et coll.* montrent que l'injection directement dans la rate de souris de lipoplexes contenant l'ARNm codant la gp100 humaine a un effet protecteur et induit une résistance vis-à-vis de la prolifération tumorale du mélanome (Zhou, Hoon et coll. 1999). En utilisant des liposomes formés à partir du mélange DOTAP/Chol, Hess et coll. optimisent la réponse CTL spécifique de l'antigène codé par l'ARNm ovalbumine vectorisé en réalisant une co-injection de l'ARNm codant le GM-CSF (Hess, Boczkowski et coll. 2006). Hoerr et coll. ont comparé chez la souris la capacité de l'ARNm nu ou complexé à la protamine ou au mélange protamine/liposomes à induire une réponse CTL spécifique de l'antigène (Hoerr, Obst et coll. 2000). Par injection intradermique unique de 30µg d'ARN, les trois formulations permettent d'obtenir des CTLs. Seul l'ARNm formulé avec de la protamine et des liposomes permet d'obtenir une réponse cytotoxique spécifique par voie intraveineuse et sous-cutanée.

Le tableau 8 rassemble les résultats rapportés dans l'utilisation de vecteurs non-viraux pour le transfert d'A.N in vivo.

**Tableau 8 : Lipides et polymères cationiques utilisés in vivo en immunothérapie par transfert d'acides nucléiques.**

<b>Vecteur</b>	<b>Nature de l'A.N.</b>	<b>Protéine codée</b>	<b>Voie d'administration</b>	<b>Référence</b>
DOTIM:Cho	ADN	ovalbumine et $\beta$ -galactosidase	i.d., i.m., i.v.	U'Ren et coll. 2006
MF59:DOTAP	ADN	p55 gag du VIH	transabdominale	Ott et coll. 2002
chitosan	ADN	$\beta$ -galactosidase	transcutanée	Cui et coll. 2001
CTAB:DOPE +/- Man	ADN	$\beta$ -galactosidase	s.c.	Cui et coll. 2002
Man-C4-Chol +/- DOPE +/- DC-Chol	ADN	luciférase	i.p., i.m., i.v.	Kawakami et coll. 2000
Chol/Pc/PS	ARNm	NP du virus influenza	-	Martinon et coll. 1993
Liposomes HVJ (HAU/PC/Chol/DC-Chol)	ARNm	gp100	intra-splénique	Zhou et coll. 1999
DOTAP:Cho	ARNm	ovalbumine	i.d., i.v.	Hess et coll. 2006
LPD	ARNm	$\beta$ -galactosidase	i.v., s.c.	Hoerr et coll. 2000

*Abréviations: **i.d.** : injection intradermique, **i.n.**: injection intranodulaire, **i.v.**: injection intraveineuse , **s.c.** : injection sous-cutanée, **i.m.** : injection intramusculaire*



## **CHAPITRE V : L'ARN MESSAGER, CIBLE THÉRAPEUTIQUE ET PRINCIPE ACTIF.**

Dans le contexte d'une cellule eucaryote, l'ARNm se définit comme étant un polymère monocaténaire d'acides nucléiques ayant pour fonction de transférer l'information génétique contenue au niveau du noyau jusqu'aux ribosomes cytoplasmiques, où s'effectuera la synthèse protéique. Ce concept de « messenger » fut évoqué par F.Jacob et J.Monod en 1961 (Jacob et Monod 1961). L'ARNm est généré lors du processus de transcription par l'ARN polymérase II. Cette polymérisation s'effectue dans le sens 5' vers 3' de façon complémentaire et antiparallèle à la séquence ADN qui sert de matrice (brin « antisens »). Les nucléotides utilisés diffèrent de ceux de l'ADN avec un remplacement du désoxyribose par un ribose et de la thymine (T) par l'uracile (U). Le processus de transcription du gène conduit à une forme « précurseur » non fonctionnelle, l'ARN pré-messager ou pré-ARNm, correspondant à une copie intégrale du gène. Ce pré-messager contient une succession d'exons, séquences à exprimer, et d'introns, séquences intercalées. Cette molécule va donc devoir subir plusieurs étapes de maturation afin de passer à une forme fonctionnelle : l'ARNm « mature » ou l'ARNm proprement dit. A la fin de ce processus de maturation, l'ARNm est composé, de son extrémité 5' vers son extrémité 3', de 3 régions distinctes :

- la région 5' non-codante, ou 5' UTR (5' UnTranslated Region), qui est impliquée dans la stabilité, l'exportation nucléaire et le contrôle de la traduction.
- la région codante, ou cadre ouvert de lecture, ORF (Open Reading Frame) qui se définit en unités fonctionnelles de trois nucléotides appelées codons. Ces codons seront chacun traduit par les ribosomes pour positionner un acide aminé correspondant.
- la région 3' non-codante, ou 3' UTR, qui est impliquée au niveau du cytosol dans des mécanismes de régulation de la stabilité de l'ARNm, de son adressage à des ribosomes spécialisés et de sa traduction.

# **I. Synthèse, maturation et régulation de l'ARN messenger.**

## **I-A. Synthèse de l'ARN messenger ou processus de transcription.**

### **1. La transcription chez les eucaryotes.**

La transcription est le mécanisme par lequel l'information génétique est transférée de l'ADN vers l'ARN. Ce processus se déroule en trois étapes que sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. Elle est en partie concomitante avec le processus de maturation.

L'initiation de la transcription (Figure 17) est essentiellement sous le contrôle de la région 5' non-transcrite de l'ADN, en amont du premier nucléotide transcrit (point +1). Dans une région d'environ 100 pb se définit un « promoteur proximal ». Il contient des boîtes *cis*-régulatrices permettant la reconnaissance et la liaison des facteurs *trans*-régulateurs de la synthèse d'ARNm. Ainsi, située 25 à 30 bases en amont du point +1 de la transcription, se retrouve dans presque tous les gènes la « TATA box ». Mais des séquences telles que la « CCAAT box » ou encore la « GC box » peuvent également être retrouvés. L'ARN polymérase II ne se fixe pas directement sur le brin ADN à transcrire, mais par l'intermédiaire d'un complexe multiprotéique formé de TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF. Séquentiellement, l'initiation de la transcription se fait par la reconnaissance et la fixation de TFIID sur la TATA box. Puis TFIIA se fixe au complexe TFIID-ADN afin de le stabiliser. L'ARN polymérase II, associée au facteur TFIIB, se fixe ensuite au complexe TFIID-TFIIA. Enfin TFIIF aurait une activité hélicase conduisant à la dénaturation de l'ADN au point d'initiation de la transcription. C'est cet ensemble ARN polymérase II/facteurs TF qui constitue le complexe d'initiation de la transcription et qui catalyse la première liaison phosphodiester des deux premiers nucléotides de l'ARNm. Il existe d'autres séquences *cis*-régulatrices, le plus souvent distales dans la région 5' non-transcrite, où viennent se fixer des facteurs *trans*-régulateurs. Ces facteurs *trans* sont pour la plupart des protéines produites par d'autres gènes. Le couple lié élément *cis*-régulateur/ facteur *trans*-régulateur entre en contact avec le complexe d'initiation de l'ARN polymérase par l'intermédiaire d'un ensemble de protéines appelé « médiateur ». La liaison du régulateur et du médiateur nécessite un repliement de l'ADN du promoteur. De telles interactions peuvent induire une amplification (« enhancers »), ou au contraire, une diminution (« silencers ») du taux de transcription. Cette complexification du système permet de moduler plus finement l'expression d'un gène en fonction des besoins cellulaires.

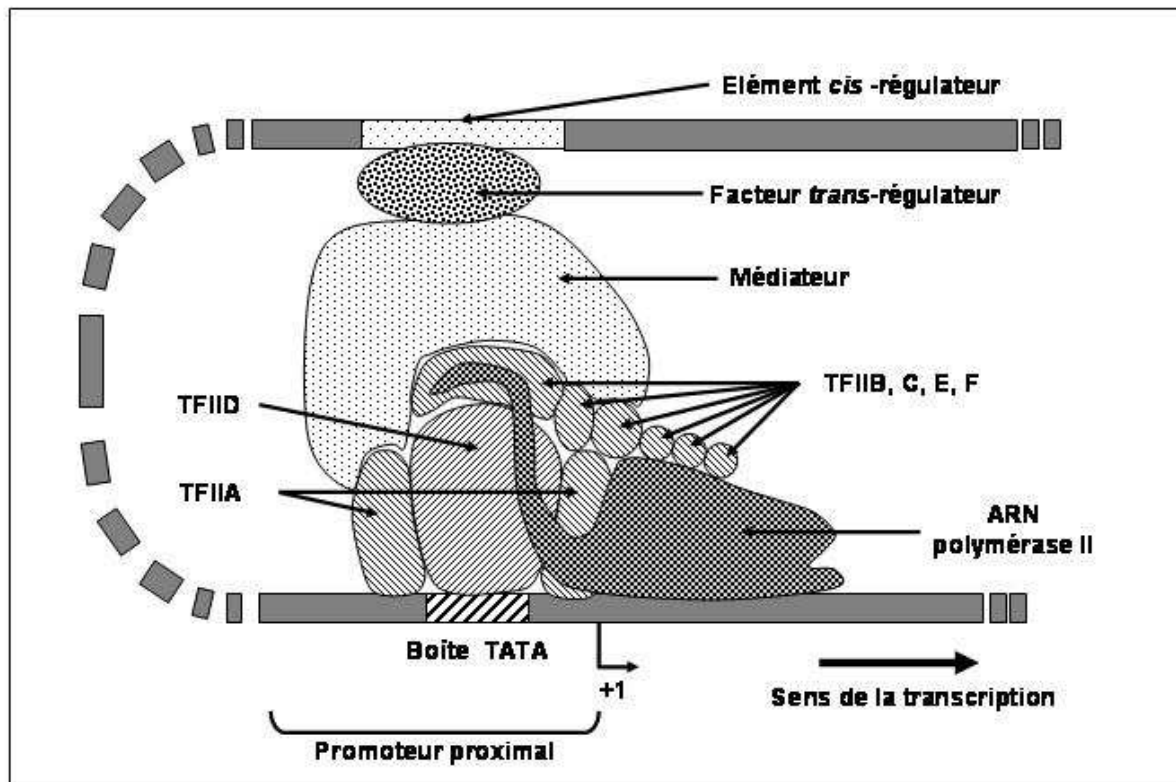


Figure 17: Schéma de l'initiation de la transcription chez les eucaryotes.

Au cours de la phase d'élongation qui suit, la ARN polymérase II est assistée par des facteurs d'élongation qui modifient la chromatine pour permettre l'avancée de l'enzyme, empêchant ainsi la formation d'obstacles structuraux comme des épingles à cheveux.

La terminaison de la transcription ne semble pas s'effectuer en un point précis du gène. Des signaux de terminaison sont cependant localisés dans la partie transcrite de l'ADN, impliquant non pas des séquences consensus, mais des structures tridimensionnelles conservées riches en GC, immédiatement suivies de séquence riches en AT. L'ARN polymérase II se détache alors du brin matrice d'ADN et relargue l'ARN pré-messager néosynthétisé.

## **2. La transcription in-vitro.**

L'ARNm d'un gène donné peut-être isolé et rétro-transcrit en un ADN double-brin appelé ADN complémentaire (ADNc). Cette séquence a pour caractéristique de correspondre à une copie parfaite d'un ARNm mature (exception faite de la cap), c'est-à-dire dépourvue d'introns. Ainsi l'insertion de cette séquence dans un plasmide, en aval d'une séquence promotrice permet une synthèse d'ARNm in-vitro (IVT-mRNA). Pour cette technique, des ARN polymérases phagiques sont mises à contribution. Les plus utilisées

sont celles du phage SP6 de *Salmonella typhimurium* ou du phage T7 d'*Escherichia coli*. Ces ARN polymérases sont très spécifiques des promoteurs correspondants.

## **I-B. Maturation de l'ARNm.**

### **1. Modification en 5' : ajout de la coiffe ou « capping ».**

Le processus de maturation des transcrits primaires commence dès la phase d'élongation de la transcription, avec l'addition de la « coiffe », ou « cap », à l'extrémité 5' du pré-messager (Figure 18 et 19, étape A). Cette première étape de maturation intervient très précocement, avant même l'assemblage des 30 premiers nucléotides du futur transcrit. Le cap correspond à une 7-méthyl-guanine monophosphate ( $_7\text{mGMP}$ ) reliée au premier nucléotide du transcrit primaire par une liaison anhydre d'acide.

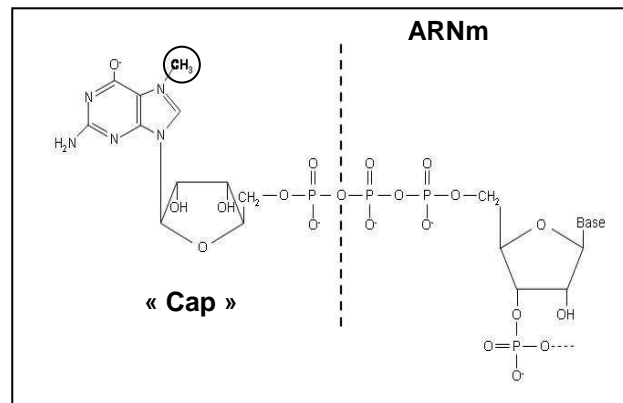


Figure 18: Représentation de la coiffe d'un ARNm

### **2. Modification en 3' : la polyadénylation.**

Une autre étape de maturation intervient après le relargage du transcrit primaire par l'ARN polymérase II. A son extrémité 3', l'ARN pré-messager va être amputé d'une vingtaine de nucléotides en aval d'une séquence consensus AAUAAA dite de « polyadénylation ». Après cette coupure, la poly(A) polymérase va ajouter en 3', et sans matrice, une succession de 100 à 250 A (Figure 19, étape B). Seuls font exception les ARNm d'histone qui sont dépourvus de cette queue poly(A).

### **3. Le processus d'épissage.**

Enfin, la dernière phase de maturation de l'ARN pré-messager est l'épissage (ou « splicing »). Ce mécanisme critique abouti à l'exsion des introns et la réunion des exons

tout en conservant le cadre de lecture (Figure 19, étape C). Il est catalysé par un assemblage nucléoprotéique complexe, le spliceosome, qui se positionne au niveau de l'intron à éliminer. Il peut être décomposé en 2 étapes et fait intervenir 3 sites majeurs que sont :

- le doublet GU, ou « site donneur d'épissage », présent à l'extrémité 5' de tous les introns.
- le doublet AG, ou « site accepteur d'épissage », présent à l'extrémité 3' des introns.
- le « site de branchement du lasso », ou « A de branchement », correspondant à un AMP situé à environ -30 nucléotides de l'extrémité 3' de l'intron.

Séquentiellement, il y a tout d'abord un clivage en 5' de l'intron en amont du doublet GU. Le GMP engage son 5'P dans une liaison covalente avec le 2'OH du A de branchement, formant ainsi une structure en lasso ou « lariat ». S'en suit un clivage en 3' du doublet AG de l'intron et une liaison du 3'OH de l'exon amont avec le 5'P de l'exon aval.

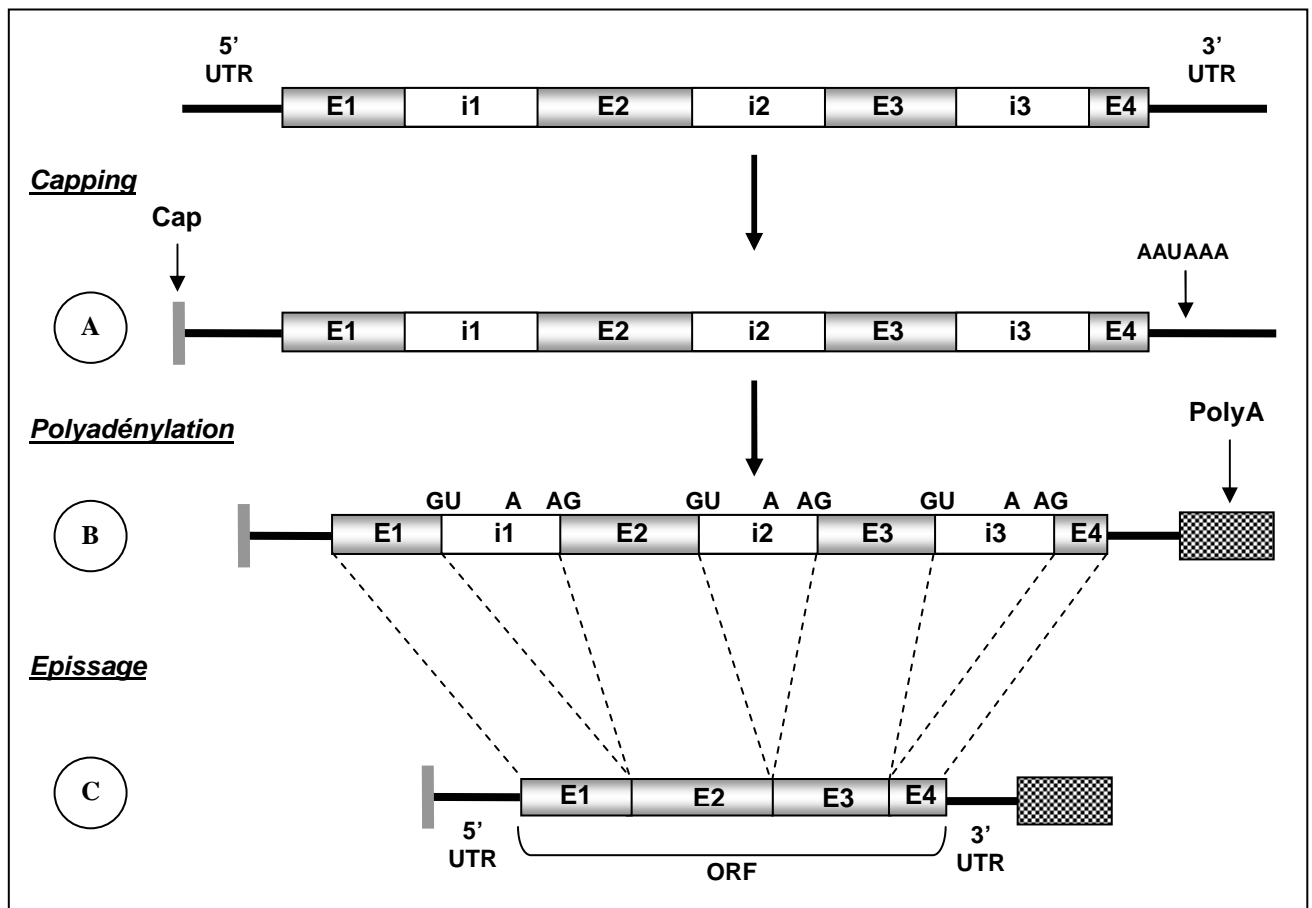


Figure 19 : Représentation des différentes étapes de maturation d'un ARNm

## **I-C. Régulations de l'ARNm.**

Afin de contrôler plus finement le transfert de l'information génétique contenue au niveau du compartiment nucléaire jusqu'aux ribosomes, plusieurs étapes de régulations des ARNm interviennent. Le mécanisme principal de régulation est la dégradation. La plupart des acteurs de ce processus ont été mis en évidence en utilisant le modèle de levure.

Classiquement, la dégradation intervient après le clivage de la queue poly(A). La déadénylation de l'extrémité 3' se fait par deux voies redondantes. La première dépend du complexe Pan2/ Pan3 qui forme la poly(A) nucléase. Ce complexe se lie à l'ARNm via la Pab-1 (Poly(A)-binding protein1) avant même son exportation nucléaire (Brown et Sachs 1998) et catalyse la déadénylation au niveau cytoplasmique (Boeck, Tarun et coll. 1996; Brown, Tarun et coll. 1996). La deuxième implique le complexe Ccr4/Caf1 (Carbone catabolite repression 4/ Ccr4-associated factor 1) également défini comme régulateur de la transcription. Cependant si ce complexe optimise l'activité poly(A) nucléase, il ne possède pas d'activité de déadénylation (Tucker, Valencia-Sanchez et coll. 2001).

Dans la partie 5', la  $\gamma$ mGMP évite à l'ARNm d'avoir une extrémité 5' phosphate libre qui serait sensible aux phosphatases et aux 5' exonucleases. Outre cette fonction protectrice, le cap est indispensable dans les cellules eucaryotes à l'initiation de la traduction. Dans le mécanisme de dégradation, le « decapping » intervient très vite après la déadénylation. Il est réalisé chez la levure par Dsp1 mais fait intervenir de nombreux autres facteurs tels que Dcp2, Vps16, Pat1 et les protéines LSM (Dunkley et Parker 1999; Zhang, Williams et coll. 1999; Bonnerot, Boeck et coll. 2000). Suite à cette étape, le transcrit devient sensible à la 5' exonucléase Xrn1 car il possède un groupement phosphate exposé à son extrémité 5' (Hsu et Stevens 1993).

Chez les eucaryotes supérieurs, bien que le decapping soit également une étape importante dans la dégradation déadénylation-dépendante, le découplage entre les fonctions stabilisatrices des extrémités 5' et 3' semble moins évident (Gao, Wilusz et coll. 2001). Cette difficulté à différencier le rôle de chacune d'entre-elles vient de leur étroite collaboration dans les différentes étapes du processus. En effet, la queue poly(A) inhibe la dégradation de l'ARNm en interagissant avec les PABP (Poly(A)-Binding Protein). Ces dernières se lient au facteur d'initiation de la traduction eIF4G, lui-même interagissant avec un autre facteur de cette famille, eIF4E, lié à la coiffe du transcrit. Il en résulte une circularisation de l'ARNm. Cette structure facilite l'entrée en traduction du messenger et le stabilise en évitant sa déadénylation par la PARN (Poly(A)RiboNuclease) et son decapping (Wells, Hillner et coll. 1998; Dehlin, Wormington et coll. 2000; Gao, Fritz et coll. 2000).

D'autres éléments *cis*-régulateurs sont impliqués dans la stabilité des ARNm. Ainsi dans la partie 3' UTR de certains ARNm codant pour des cytokines, des facteurs de croissances et des proto-oncogènes, se retrouvent des séquences riches en A et U appelées AREs ou AUREs (A+U-Rich Elements) (Chen et Shyu 1995). Ces AREs peuvent être classés en fonction de leur homologie de séquence et de leur capacité à induire une dégradation rapide du transcrit par déadénylation. De nombreuses protéines, les AUBPs (AURE-Binding Proteins), se lient sur ces séquences et agissent ainsi sur la localisation intracellulaire des ARNm, leur stabilité et leur traduction.

## **II. L'ARNm en thérapie : de la cible au principe actif.**

L'idée utiliser l'ARN à des fins thérapeutiques apparaît dès 1969 avec la découverte des propriétés immunostimulantes de l'ARN double-brin (Absher et Stinebring 1969). Puis des résultats prometteurs en thérapie anti-cancéreuse chez l'homme (Pimm et Baldwin 1976; Pimm, Embleton et coll. 1976; Carter, Hubbell et coll. 1985; Carter, Strayer et coll. 1985) ont conduit aux premiers essais cliniques (phase I/II) chez l'homme (Brodsky, Strayer et coll. 1985). Depuis ces quinze dernières années, les progrès de la biologie moléculaire et une meilleure connaissance des fonctions biologiques des ARNs, n'ont fait qu'augmenter l'intérêt pour ce type d'acides nucléiques. Les ARNs peuvent en effet permettre des interactions ARN-ARN, ARN-ADN ou ARN-protéine, ou encore, être des centres catalytiques autonomes. Concernant l'ARN messenger, il est devenu une cible aussi bien qu'un outil dans les stratégies thérapeutiques. On peut distinguer trois grandes orientations impliquant l'ARNm : l'inhibition de l'expression génique, la correction de gène et enfin l'immunostimulation.

### **II-A. Inhibition de l'expression génique.**

Une première stratégie d'inhibition de l'expression d'un gène par un ARN est basée sur la complémentarité de l'ARN thérapeutique dit « anti-sens » avec l'ARNm cible et sur la formation d'un duplex ARN-ARN. Ce processus naturel d'extinction de gène a été découvert chez les procaryotes (Green, Pines et coll. 1986) et a d'abord été utilisé chez les bactéries (Coleman, Green et coll. 1984; Pestka, Daugherty et coll. 1984), puis les cellules eucaryotes (Izant et Weintraub 1985). Les études ainsi menées ont montré que l'efficacité de cette méthode est tributaire d'un excès d'ARN antisens par rapport à son ARNm cible.

Une autre méthode dite d'« ARN interférence » (ARNi) consiste à l'utiliser un ARN double-brin (ARNdb) correspondant à la séquence de l'ARNm cible. On peut utiliser un ARNdb de taille égale à la cible et transcrit par l'ARN polymérase III, ou un duplex d'oligonucléotides synthétiques de 21 à 23 nucléotides (Hannon 2002).

Les ribozymes sont des ARN qui possèdent une séquence capable de s'hybrider avec l'ARNm cible et une séquence catalytique permettant de couper celui-ci. Le développement de ribozymes trans-actifs résistants aux nucléases a permis d'augmenter leur stabilité dans les fluides biologiques. Trois de ces molécules ont ainsi pu accéder à des essais cliniques pour lutter contre le cancer et ont permis d'obtenir des résultats encourageants (Usman et Blatt 2000).

Enfin le transfert d'introns mobiles du groupe II repose sur l'extinction de l'expression génique par interaction ARN-ADN. Les introns ARN s'insèrent par complémentarité de bases et inactivent la transcription du gène pathogène (Guo, Karberg et coll. 2000). L'avantage de cibler l'ADN plutôt que l'ARNm est que chaque événement d'hybridation induit la disparition de tout ARNm correspondant au gène éteint.

## **II-B. Correction de l'expression génique.**

En agissant pendant la maturation de l'ARN pré-messager au niveau de l'épissage des séquences introniques, deux grandes stratégies de correction de l'expression génique peuvent être envisagées. Ce sont des approches par « épissage en *trans* » (*trans*-splicing). La première stratégie utilise les propriétés catalytiques des ribozymes pour substituer la séquence mutante de l'ARN cible par la séquence sauvage apportée par le ribozyme (Watanabe et Sullenger 2000). La seconde approche, appelée « SmaRT » (spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing), conserve un épissage par le spliceosome. Un ARN de pré-trans-épissage (PTM) est exprimé dans la cellule et un duplex PTM/pré-ARNm cible se forme au niveau de la partie intronique du pré-ARNm. L'épissage par le spliceosome conduit au remplacement de la séquence mutante de l'ARN cible par la séquence sauvage apportée par le PTM. Cependant ces deux techniques présentent des faiblesses dans la spécificité vis-à-vis de leur ARN cible qu'il reste à surmonter (Kikumori, Cote et coll. 2001).

## **II-C. Immunostimulation.**

Les ADN plasmidique sont les plus utilisés dans les approches non-virales de transfert de gène et la vaccination. Cependant, une limitation majeure dans le transfert d'ADN dans les cellules quiescentes et en particulier les DCs est la nécessité de passer de



l'enveloppe nucléaire pour obtenir l'expression de l'antigène. Les techniques de production et de purification sont peu coûteuses comparées aux autres approches, notamment peptidique, mais la production normalisée à grande échelle pour des applications cliniques reste délicate (Schleef et Schmidt 2004) et les résultats chez l'homme sont moins encourageants que ceux obtenus chez la souris (Ulmer 2001). De plus, un risque d'intégration au génome et d'induction d'anticorps anti-ADN a été rapporté (Klinman, Takeno et coll. 1997; Donnelly, Berry et coll. 2003). Dès 1996, Boczkowski et coll. rapportent que le transfert d'ARNm des tumeurs dans les DCs permet l'induction d'une réponse immune antitumorale *in vitro* et *in vivo* (Boczkowski, Nair et coll. 1996). La délivrance de l'ARNm dans le cytosol des DCs est suffisante pour la synthèse de la protéine codée. L'absence de promoteur et de gènes de résistance aux antibiotiques rend cette approche plus sécurisante que le transfert d'ADN. Les résultats accumulés depuis ces 10 dernières années confirment l'efficacité de cette stratégie.

Les premiers travaux sur la comparaison d'efficacité d'expression d'un transgène après transfert d'ARN ou d'ADN dans des DC humaines sont ceux de Strobel et coll. (2000). Les taux de transfection obtenus par des liposomes commerciaux sont supérieurs à 20% de cellules transfectées, contre 10% pour l'ADN plasmidique correspondant. Ils montrent de plus que la lipofection d'un ARNm codant l'antigène M1 du virus de la grippe conduit à une présentation antigénique plus efficace qu'avec l'ADN. En 2001, Van Tendeloo et coll. ont rapporté que le transfert d'ARNm dans les DCs par électroporation est plus efficace pour l'expression protéique du transgène que le transfert de l'ADN correspondant (Van Tendeloo, Ponsaerts et coll. 2001). Plus de 50% des DCs sont modifiées, et ceci quelque soit leurs origines (dérivées de monocytes, de précurseurs CD34+ ou différenciées en cellules de Langerhans). La viabilité des cellules est également améliorée. L'électroporation des DCs avec l'ARNm MelanA/MART-1 permet *in vitro* une forte stimulation HLA-restreinte de clones T CD8<sup>+</sup>. Au contraire, aucune induction de CTL n'est observable après transfert de l'ADN plasmidique correspondant.

L'ARNm transféré par électroporation dans les DCs humaines est détectable dès 15 min après traitement. Une expression protéique du transgène est observable au bout de 4h (Eppler, Horig et coll. 2002), ou 3h dans le cas des DCs murines, et ceci de manière dose-dépendante (Van Meirvenne, Straetman et coll. 2002). Un fort taux d'expression peut se maintenir pendant 5 jours après transfert (Saeboe-Larssen, Fossberg et coll. 2002).

En fonction des stratégies thérapeutiques envisagées, plusieurs sources d'ARNm peuvent être exploitées. Lorsqu'aucun TAA n'est identifié ou si une réponse immune contre plusieurs antigènes d'une tumeur donnée est désirée, les ARNm totaux de la tumeur peuvent être utilisés. En 1996, les travaux de Gilboa et Nair montrent que seule la composante « ARNm » des ARN tumoraux totaux est nécessaire et suffisante pour une

réponse immune *in vitro* et *in vivo* (Boczkowski, Nair et coll. 1996). Ces ARNm totaux issus de la tumeur d'un patient peuvent être simplement isolés (Boczkowski, Nair et coll. 1996; Heiser, Maurice et coll. 2001) ou bien amplifiés (Boczkowski, Nair et coll. 2000). Ils peuvent également être obtenus à partir de lignées cellulaires modèles (Mu, Kyte et coll. 2005). Si une réponse immune contre un TAA connu est souhaitée, une approche par transfert d'ARNm transcrit *in vitro*, ou IVT-mRNA (In Vitro Transcribed mRNA) sera la plus adaptée. L'ARNm transcrit peut correspondre à la séquence propre de l'antigène natif (Koido, Kashiwaba et coll. 2000) ou à une séquence modifiée. Ces modifications peuvent porter sur l'ajout d'une séquence signal permettant un adressage préférentiel de l'antigène produit vers la voie de dégradation lyzosomique et donc une présentation des peptides résultants sur les molécules du CMH-II (Nair, Boczkowski et coll. 1998; Su, Vieweg et coll. 2002; Bonehill, Heirman et coll. 2004). Elles peuvent aussi permettre d'optimiser l'épitope majoritairement présenté au système immunitaire (Abdel-Wahab, Kalady et coll. 2003).

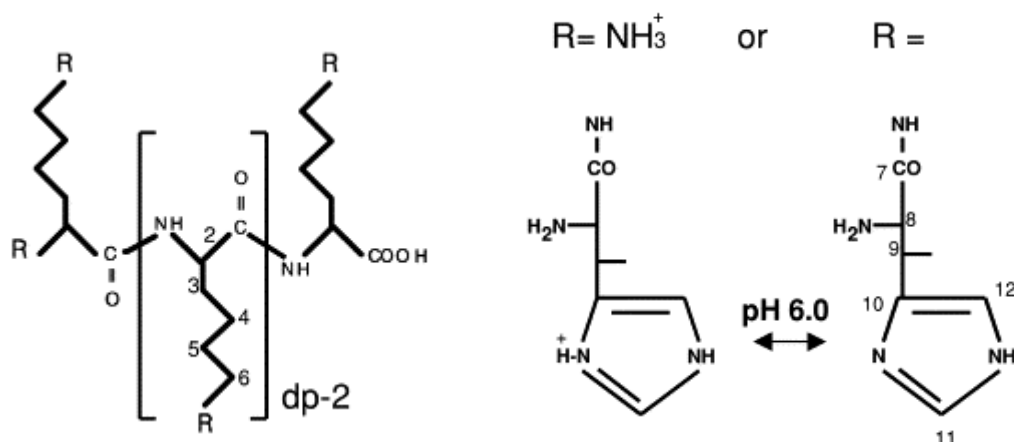
## **CHAPITRE VI : LES VECTEURS HISTIDYLÉS.**

### **I. Polymères et peptides cationiques riches en histidine.**

Des peptides non chargés à pH neutre n'interagissant ni avec la membrane plasmique ni avec les protéines sériques mais ayant des propriétés fusiogènes uniquement en milieu acide sont d'un grand intérêt pour assurer le passage d'A.N. au travers des compartiments d'endocytose. De tels peptides ou polypeptides peuvent être élaborés en utilisant l'histidine. En 1984, Wang et Huang ont mis en évidence les propriétés fusiogènes en milieu acide de la poly-L-histidine vis-à-vis de liposomes anioniques (Wang et Huang 1984). Ces propriétés fusiogènes, très supérieures à celles de la poly-L-lysine, sont induites après la protonation du noyau imidazole des histidines lorsque le pH est inférieur à 6 (Uster et Deamer 1985). En transposant ces résultats aux membranes cellulaires, les résidus histidine pourraient être utilisés pour favoriser la délivrance des A.N. dans le cytosol lors de leur passage dans les compartiments acides tels que les endosomes. Sur ce principe, des vecteurs riches en histidines ont été développés par l'équipe du Dr Patrick Midoux.

Le peptide H5WYG (GLFHAIAHFHGGWHGLIHGWYG) a été conçu sur le modèle de fragment N-terminal de la sous-unité HA2 de l'haemagglutinine du virus de la grippe (Midoux, Kichler et coll. 1998). Il correspond à l'analogue histidylé du peptide anionique E5WYG qui a des propriétés fusiogènes en milieu acide comme le fragment N-terminal de l'haemagglutinine du virus de la grippe (Kichler, Freulon et coll. 1999). H5WYG perméabilise les membranes cellulaires à pH 6,8 correspondant au pH des endosomes précoces. Cette valeur de pH est inférieure d'environ 1 unité à celle de l'analogue anionique E5WYG. Contrairement aux peptides anioniques qui forment une hélice  $\alpha$  en milieu acide, le peptide H5WYG ne s'organise pas en une telle structure ordonnée. L'utilisation de H5WYG à 10  $\mu$ M avec des polyplexes formés de polylysine glycosylée augmente significativement l'efficacité de transfection dans plusieurs lignées cellulaires. A l'inverse des peptides anioniques, l'effet du peptide H5WYG n'est pas altéré en présence de sérum.

Sur la base des résultats obtenus avec le peptide H5WYG, une polylysine partiellement histidylée (HpK) a été élaborée (Figure 20). Ce polymère cationique combine à la fois les propriétés de condensation de l'ADN de la polylysine pour former des polyplexes et la capacité de déstabiliser des membranes intracellulaires en milieu acide par les histidines.

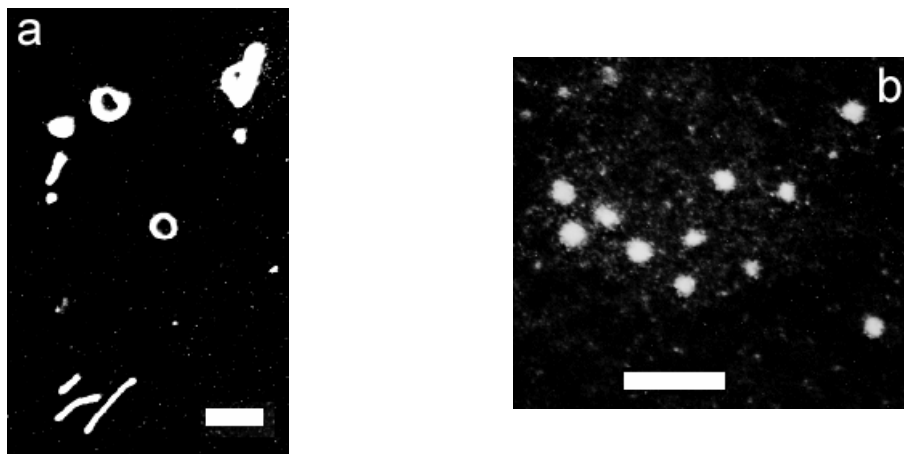


**Figure 20: Structure de la polylysine histidylée (HpK).**

*D'après Pichon et coll.(Pichon, Goncalves et coll. 2001).*

dp: degré de polymérisation.

A pH neutre, les polyplexes histidylés formés dans un rapport de charges N/P de 3,4 ont un potentiel de charge globale ( $\zeta$ ) de + 18 mV. A pH inférieur à 6, leur potentiel  $\zeta$  augmente jusqu'à + 40 mV du fait de la protonation des groupes imidazoles (Bello Roufai et Midoux 2001). Ceci suggère qu'une fois internalisés, une augmentation du nombre de charges cationiques peut se faire dans la lumière des endosomes engendrant ainsi une déstabilisation acide-dépendante des membranes. L'ADN plasmidique complexé à une polylysine d'un degré de polymérisation (dp) de 190 substituée de 109 résidus histidine forme des toroïdes de diamètre moyen égal à 130 nm mesuré à la fois par diffusion de la lumière en milieu quasi élastique (QELS: Quasi Elastic Light Scattering) et par microscopie électronique à transmission. Cependant, dans les conditions de force ionique physiologiques, les polyplexes forment des agrégats. La taille de ces polyplexes peut être stabilisée à 100 nm et à 50 nm en présence respectivement de 10% et 50% de sérum. De plus, la charge globale des polyplexes histidylés en présence de sérum passe à - 25 mV, ce qui a pour conséquence une diminution des interactions non spécifiques avec la surface des cellules. Comme il a été décrit pour d'autres polymères cationiques, la fixation d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) de masse molaire de 5 kDa par molécule de HpK empêche la formation d'agrégats dans les conditions physiologiques en sels et réduit le potentiel  $\zeta$  à + 6 mV (Figure 21a) (Erbacher, Bettinger et coll. 1999; Ogris, Brunner et coll. 1999). Une version plus courte HoK (polylysine de dp 19) et plus substituée en résidus histidylés a été développée pour transférer efficacement des oligonucléotides de 20 à 30 bases (Pichon, Roufai et coll. 2000). Les complexes obtenus forment des sphères d'environ 35 nm de diamètre (Figure 21b).



**Figure 21: Images de microscopie électronique à transmission des polyplexes ADNp/PEG-HpK (a) et des polyplexes oligonucléotide/PEG-HoK (b).**

Échelle = 100 nm. Les observations ont été réalisées au microscope électronique à transmission. D'après Pichon et coll. (2001).

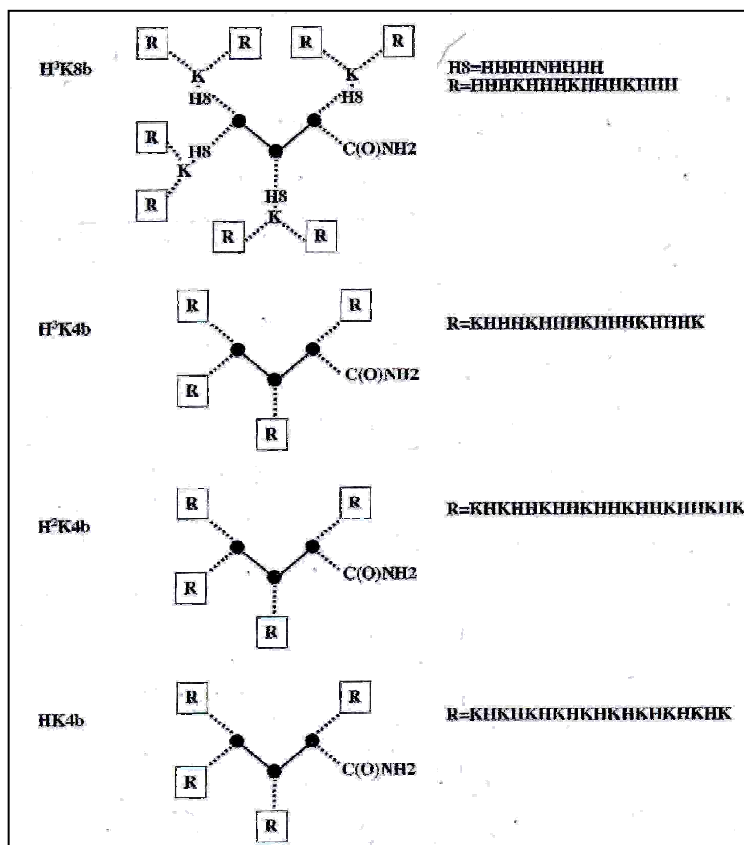
Depuis ces travaux, d'autres équipes ont développé des polymères et des peptides cationiques riches en histidine pour la transfection des cellules (Tableau 9). Il a notamment été préparé un polymère de N-Ac-poly(L-Histidine) greffé à de la polylysine (Benms, Choi et coll. 2000). Putnam et coll. ont utilisé la polylysine et la polylysine PEGylée substituée par des noyaux imidazoles (ImpK) et non d'histidine (Putnam, Gentry et coll. 2001; Putnam, Zelikin et coll. 2003). Kichler et coll. ont utilisé un peptide antibiotique riche en histidine [LAH]<sub>4</sub> (Kichler, Leborgne et coll. 2003). L'équipe de L.W. Seymour a mis au point le polymère HIS6 RPC (Read, Singh et coll. 2005). C'est un polymère d'une cinquantaine de monomères (CHHHHHHKKKHHHHHC) reliés par des ponts disulfures entre les cystéines. Chaque monomère étant trop court pour condenser l'ADN, la réduction des ponts disulfures peut induire un relargage de l'ADN du vecteur dans le cytosol. Ce polymère s'est montré plus efficace que la PEI branchée de 25 kDa tout en étant très peu toxique. Ce vecteur permet également le transfert d'ARNm et de ARNi. Nous citerons aussi les peptides CHKHKHHKHC et le CHK<sub>6</sub>HC développé par McKenzie et coll. qui utilisent les cystéines pour stabiliser les polyplexes (McKenzie, Smiley et coll. 2000).

Des polymères formés avec des peptides riches en histidines HK ou HHK, linéaires ou branchés, ont été développés par Chen (2000; 2001; 2002), Aoki (2001) et Leng (2005) (Figure 22). Certains ont été substitués par un ligand tel que le peptide cyclique RGD pour transfecter plus efficacement des tumeurs *in vivo*. Nous noterons l'approche originale développée dans ce sens par Hatefi et coll. avec la production d'une protéine chimérique correspondant au facteur de croissance bFGF2 fusionné à une polylysine histidylée (KHKKHKHKHKK)<sub>6</sub> (Hatefi, Megeed et coll. 2006). Le bFGF2 permettant dans ce cas un ciblage des cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur correspondant. D'autres

structures plus complexes ont été élaborées tels que les dendrimères KGH6 (Figure 23) (Okuda, Sugiyama et coll. 2004). Des microsphères substituées par une polylysine histidylée  $K_{10}H_6$  ont été utilisées pour une transfection efficace *in vitro* de DCs murines par de l'ADN plasmidique (Jia, Kovacs et coll. 2006). Pour finir, un polymère (CDPim) contenant de la cyclodextrine- $\beta$  et des résidus imidazoles a été développé par Davis et coll. (Davis, Pun et coll. 2004). Il présente une meilleure efficacité de transfection dans les cellules HeLa, BHK-1 et 293 que le produit (CDP) dépourvu d'imidazole.

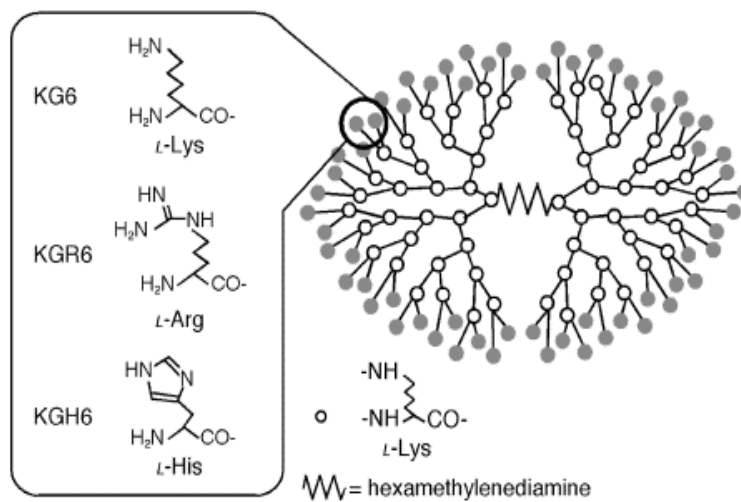
**Tableau 9: Peptides riches en histidines**

Séquences peptidiques	Références
HpK	(Midoux et Monsigny 1999)
HoK	(Pichon, Roufai et coll. 2000)
PLH-g-PLL	(Benns, Choi et coll. 2000)
ImpK et ImpK-PEG	(Putnam, Gentry et coll. 2001; Putnam, Zelikin et coll. 2003)
CHKHKHHKHC; $CHK_6HC$	(McKenzie, Smiley et coll. 2000)
$LAH_4 = K_2AL_2ALALH_2LAHLALHLALALK_2A$	(Kichler, Leborgne et coll. 2003)
Dendrimère KGH6	(Okuda, Sugiyama et coll. 2004)
HK et HHK4b : $[KHKH_2KH_2KH_2KH_2KH_2KH_2]_4K_3$	(Chen, Zhang et coll. 2000; Chen, Zhang et coll. 2001; Chen, Zhang et coll. 2002)
HHHK8b	(Leng, Scaria et coll. 2005)
cRGD-(H)KKKK <sub>6</sub>	(Aoki, Hosaka et coll. 2001; Yu, Pirollo et coll. 2004)
CDPim = $\beta$ -cyclodextrine histidylée	(Davis, Pun et coll. 2004)
MS(O10H6) = Microsphères substituées par $K_{10}H_6$	(Jia, Kovacs et coll. 2006)
$(KHKHKHKHKK)_6$ -FGF <sub>2</sub>	(Hatefi, Megeed et coll. 2006)
HIS6 RPC = $(CHHHHHHKKKHHHHHHC)_n$	(Read, Singh et coll. 2005)



**Fig 22: Structure des peptides HK**

*D'après Leng et coll.(2005)*

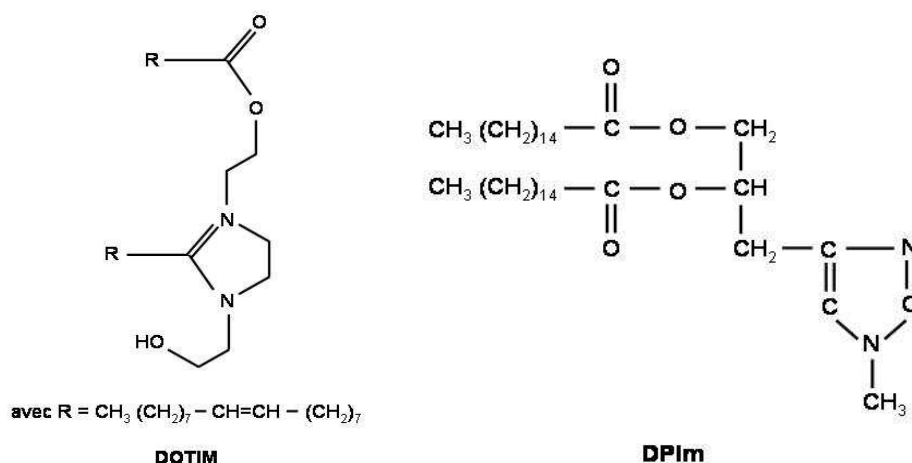


**Fig 23: Structure des dendrimères KG6H**

*D'après Okuda et coll. (2004)*

## II. Lipides cationiques riches en histidine.

Les premiers lipides cationiques contenant des résidus imidazolynium ont été développés par Solodin et coll. (1995) et plus particulièrement étudiés par le groupe de Debs R. (Gaensler, Tu et coll. 1999; Liu, Thor et coll. 1999; Meuli-Simmen, Liu et coll. 1999). Ainsi le DOTIM (Figure 24), associé au cholestérol et au DOPE, a montré de bons résultats pour transférer des gènes *in vivo*. Budker et coll. ont développé une série de lipides pH-sensibles contenant un noyau imidazole protonable (Figure 24). Le DPlm associé à la DOPE, forme des liposomes qui permettent un transfert de gènes plus efficace que le DOTMA dans des cellules en culture (3T3) suite à la protonation de l'imidazole dans les endosomes (Budker, Gurevich et coll. 1996).

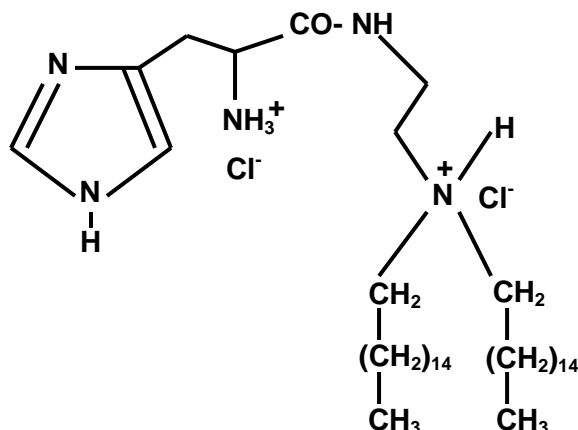


**Figure 24 : Structure du DOTIM et du DPlm**

*D'après Solodin et coll. (1995) et Budker et coll. (1996).*

Suite aux bons résultats obtenus avec les polymères histidylés, l'équipe du Dr P.Midoux a développé des lipides cationiques histidylés en collaboration avec le Dr A.Chaudhuri en Inde. Ainsi la L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)éthylamide (HDHE) associée au cholestérol forme des liposomes cationiques fusiogènes en milieu acide ( $5 < \text{pH} < 7$ ) (Kumar, Pichon et coll. 2003) (Figure 25). Ces liposomes ont une taille de 78 ( $\pm 24$ ) nm et une charge globale de surface de + 32 ( $\pm 1,5$ ) mV à pH neutre. Leur combinaison avec de l'ADN plasmidique conduit à la formation de lipoplexes de 490 ( $\pm 20$ ) nm ayant un potentiel  $\zeta$  de - 2,5 mV. Cette formulation a une efficacité de transfection comparable à celle du FuGENE 6 et au DC-Chol/DOPE sur les lignées cellulaires A549, 293T7 et HeLa, et supérieure dans le cas des cellules HepG2.



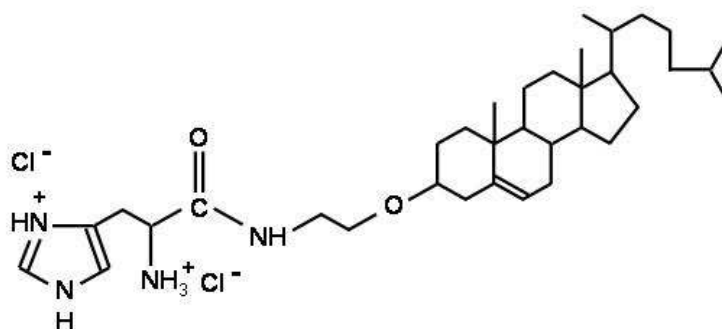


**Fig 25: Structure de la HDHE**

*D'après Kumar et coll. (2003)*

La substitution du N-N-di-n-hexadecylamine éthylamide par 2 et 3 résidus histidylés a été réalisée afin de voir si l'efficacité de transfection était augmentée par rapport à la mono substitution (lipide HDHE) (Karmali, Majeti et coll. 2006). Les résultats rapportés ne semblent pas indiquer d'augmentation spectaculaire de l'efficacité de transfection avec les lipides di- et tri-histidylés par rapport au HDHE.

Le L-histidine-cholestéryl-éthylamide (HIS-Chol, Figure 26) a également été synthétisé (Singh, Goncalves et coll. 2004). L'utilisation de DOPE comme colipide conduit à la formation de liposomes avec un potentiel  $\zeta$  de  $-8 (\pm 2)$  mV à pH 7. L'ajout d'ADN plasmidique, dans un rapport molaire lipide/ADN de 3,6, forme des lipoplexes de  $205 (\pm 60)$  nm ayant un potentiel  $\zeta$  de  $-44,5 (\pm 6)$  mV à pH7 et de  $+18 (\pm 12)$  mV à pH 5,4. Ces lipoplexes permettent un transfert de gènes efficace et de façon pH-sensible dans différentes lignées cellulaires (A549, 293T7 et HeLa) avec une absence de toxicité.



**HIS-Chol: L-histidine-cholesteryl-ethylamide**

**Figure 26: Structure du HIS-Chol**

*D'après Singh et coll. (2004)*

## **RÉSULTATS**

## **1<sup>ère</sup> PARTIE**

### **Transfert de l'ARNm d'un antigène tumoral dans les cellules dendritiques.**

#### **RÉSUMÉ**

L'utilisation de l'ARN messager (ARNm) codant pour une protéine présente un avantage considérable par rapport à celle de son ADN pour la transfection des cellules différenciées ne se divisant pas ou peu telles que les cellules dendritiques (DCs). En effet, le mécanisme de traduction de l'ARNm en protéine s'effectuant dans les cellules au niveau du cytosol, son utilisation permet de s'affranchir du passage de l'enveloppe nucléaire indispensable pour obtenir l'expression du gène à partir de l'ADN. Cependant, pour transfecter des DCs, il est nécessaire de développer des formulations permettant une introduction efficace de l'ARNm et une expression maximale de la protéine antigénique codée. Dans ce sens, nous avons cherché à optimiser d'une part le transcrit d'ARNm, et d'autre part les vecteurs permettant leur délivrance dans les DCs. Ces dernières étaient des DCs de lignée murine JAWSII, des DCs humaines dérivées de précurseurs hématopoïétiques CD34+ ou de monocytes du sang périphérique.

#### **I. Modifications des extrémités 5' et 3' non codantes de l'ARNm et leur effet sur l'expression de la protéine après transfection.**

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à modifier les parties 5' et 3' non-codantes de l'ARNm afin d'obtenir une expression protéique maximale. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans *Biochemical and Biophysical Research Communications* en 2006. Pour la synthèse *in vitro* d'ARNm, nous avons utilisé le 3'-O-méthyl-m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G, un analogue de la coiffe appelé ARCA (anti-reverse cap analogue) à la place de la 7-méthyl-guanine classique (CAP). Cet analogue ARCA évite la mise en place d'une coiffe en orientation inverse, anomalie rendant la traduction de l'ARNm inactive. Après transfection dans des DCs murines (cellules JAWSII) à l'aide de la lipofectAMINE, l'ARNm possédant la coiffe ARCA et codant la luciférase (Luc) permet une expression protéique 20 fois supérieure à celle obtenue avec un ARNm muni de la coiffe CAP. En ajoutant en *cis* au niveau de la queue poly(A) de l'ARNm, 100 adénosines au lieu de 64, le taux d'expression de la protéine rapporteur est augmenté d'un facteur 30. Cette partie 3'-terminale de l'ARNm

est connue pour jouer un rôle important dans la stabilité et la traduction des ARNm. Enfin, l'association de ces deux modifications en 5' et 3' conduit à la synthèse d'un ARNm nommé ARCA-Luc-A100 qui s'avère 700 fois plus efficace que la version CAP-Luc-A64. La supériorité de ce transcrit est également démontrée pour un ARNm codant l'antigène tumoral MelanA/MART-1. Nous montrons aussi que la co-transfection de séquences poly(A) libres et de l'ARNm ARCA-Luc-A100 permet de doubler le niveau d'expression de la luciférase dans les DCs murines.

L'effet de ces modifications 5' et 3' de l'ARNm est conservé lors de la transfection de DCs humaines (hDCs) dérivées de précurseurs CD34<sup>+</sup>. Bien que les valeurs obtenues soient plus faibles que pour les DCs murines, nous montrons qu'effectivement la transfection de l'ARNm ARCA-Luc-A100 permet une activité luciférase 12 fois supérieure à celle observée avec l'ARNm CAP-Luc-A100 dans les hDCs matures. Nous notons que la transfection des hDCs matures est supérieure à celle des hDCs immatures.

Nous avons donc optimisé un transcrit d'ARNm (ARCA-ARNm-A100) qui permet une expression protéique efficace dans les DCs après lipofection. Un tel transcrit trouve un intérêt tout particulier en immunothérapie cellulaire antitumorale. En effet, il permettra un chargement correct des hDCs avec l'ARNm d'antigènes tumoraux pour une présentation antigénique et une réponse antitumorale efficace.

## **II. Transfection des cellules dendritiques humaines par des complexes ARNm/vecteur histidylé.**

Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc attachés à évaluer l'efficacité des vecteurs histidylés pour le transfert de l'ARNm ARCA-MART1-A100 dans les hDCs. Nous avons plus particulièrement testé deux types de vecteurs cationiques : le polymère PEI-HIS, un dérivé histidylé de la polyéthylèneimine) et les liposomes HDHE : Cho, un mélange de L-histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide et de cholestérol. Des polyplexes (ARNm/polymère), des lipoplexes (ARNm/liposome) et des lipopolyplexes (ARNm/polymère/liposomes) ont été préparés. Nous montrons que les lipoplexes et les lipopolyplexes ne permettent pas une expression correcte de la protéine antigénique MART1 dans les hDCs. Au contraire, le polyplexe ARNm/PEI-HIS s'avère particulièrement efficace dans les hDCs matures. En optimisant le protocole de culture cellulaire, il est possible d'obtenir environ 50% de hDCs matures exprimant la protéine MART1 en utilisant les polyplexes PEI-HIS/ARNm MART1. Cependant, le polymère cationique PEI-HIS semble inopérant pour le transfert dans les hDCs immatures. Des études menées pour connaître l'internalisation des polyplexes ARNm/PEI-HIS mettent en évidence un trafic intracellulaire

différent selon l'état de maturation des hDCs. La voie d'endocytose suivie par les polyplexes dans les hDCs immatures ne semble pas passer par des vésicules acides, ce qui rend donc inactives les propriétés fusiogènes pH-sensibles qui caractérisent le polymère cationique histidylé pour délivrer l'ARNm dans le cytosol.

**Modifications des extrémités 5' et 3' non codantes de  
l'ARNm et leur effet  
sur l'expression de la protéine après transfection.**

## mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains *in cis* and *in trans* for a high protein expression level

Michael Mockey <sup>a</sup>, Cristine Gonçalves <sup>a</sup>, Franck P. Dupuy <sup>b</sup>, François M. Lemoine <sup>b</sup>,  
Chantal Pichon <sup>a</sup>, Patrick Midoux <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, affiliated to the University of Orléans and INSERM, rue Charles Sadron,  
45071 Orléans cedex 2, France

<sup>b</sup> Service de Biothérapies, UMR CNRS 7087, UPMC, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 83 Bd de L'hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

Received 7 December 2005

Available online 27 December 2005

### Abstract

The occurrence of translation mechanism in the cytosol offers advantages to mRNA transfer over DNA-based transfection in non-dividing cells. Here, we sought to optimize mRNA constructs allowing a high level of protein upon lipofection. We found that luciferase into mouse dendritic cells (JAWSII cells) was ~20-fold higher when the luciferase mRNA was capped with 3'-O-methyl-m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G (anti-reverse cap analogue; ARCA) than with m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G (CAP). Adding a Poly(A) tail of 100 instead of 64 adenosines *in cis* increased by ~35-fold more the protein level. Finally, ARCA-Luc-mRNA-A100 construct was 700-fold better efficient than the CAP-Luc-mRNA-A64 one. Moreover, co-transfection with free Poly(A) chains *in trans* enhanced by 100% the luciferase level. The efficiency of ARCA-mRNA-A100 construct was validated in immature and mature human CD34-derived dendritic cells. Such mRNA construct was also successful to obtain high level of MART-1 tumor antigen.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** mRNA transfection; Dendritic cells; Capping; Poly(A) chains; Cap; 3'UTR; 5'UTR; Lipofection

Gene-modified dendritic cells (DC) are tested in cancer immunotherapy with various successes. While *ex vivo* DC transduction with plasmid DNA encoding tumor antigens or cytokines using viral vectors is efficient, safe transfection using non-viral systems is currently not enough efficient. The number of transfected DC varied between less than 1–10% using electroporation, cationic lipids or cationic polymers [1–4]. Indeed, the major limiting factors of non-viral gene delivery systems efficiency in non-dividing cells are the plasmid DNA cytosolic diffusion and its nuclear entry. Therefore, mRNA-based transfection offers several advantages over DNA-based transfection. The translation occurs in the cytosol and a transgene integration in the host

genome cannot occur upon mRNA transfection. Recently, the transfection of DC with tumor or viral antigen mRNA appears to be promising for cancer or viral vaccination as well as immunotherapeutic treatments [5,6]. However, a high level of protein upon mRNA transfection depends on the use of both an efficient transfection reagent and an optimal mRNA transcript. Several papers reported that mRNA electroporation gives usually transfection efficiencies of 50–95% vs. 10% for DNA electroporation whereas mRNA lipofection leads to 10% [for a review, see 7]. In contrast, few reports have described the influence of mRNA constructs allowing a high level of protein upon transfection [8,9].

In eukaryotic cells, mature mRNA has a tripartite structure consisting of a 5'untranslated region (5'UTR), an open-reading frame (ORF) made up of triplet codons that each encodes an amino acid and a 3'untranslated

\* Corresponding author.

E-mail address: [midoux@cnrs-orleans.fr](mailto:midoux@cnrs-orleans.fr) (P. Midoux).



region (3'UTR). Cytoplasmic mRNA contains a cap structure [m7G (5') ppp (5') N, where N is any nucleotide] at its 5' terminus and a tail of 100–250 adenosine residues [Poly(A) tail] at its 3' terminus [10,11]. Recognition of the mRNA 5' end and 40S ribosomal subunit recruitment require the initiation factor eIF4F complex [12,13]. This complex assembles the cap-binding protein (eIF4E) and an RNA helicase (eIF4A) bound via eIF4G. The latter interacts also with the eIF3 complex, which binds the 40S ribosomal subunit directly. When the ribosome concentration or the translation factors are limited, the mRNA 5' and 3' elements are recognized by initiation factors to allow ribosome binding and scanning along the 5'UTR. Poly(A) tail is important for both mRNA translation and stability. Poly(A) tail binds to the poly adenosyl binding protein (PABP) which interacts with the N-terminal part of eIF4G leading to mRNA circularization via the cap-eIF4E-eIF4G-PABP-Poly(A) complex [14]. The Poly(A) tail can bind several PABP molecules and the binding of multimerized PABP to eIF4G can increase the affinity of eIF4E for the 5' cap. This synergy between the Poly(A) tail and the 5' cap is supposed to increase the expression at the level of translation. mRNA destruction is regulated and there are several co-existing mRNA digestion mechanisms [15]. Two general pathways exist for polyadenylated mRNA degradation. In both cases, the degradation starts by the removal of the 3' Poly(A) tail and is followed by either cleavage of the 5' cap structure (decapping) and 5' to 3' exonucleotidic digestion or 3' to 5' degradation. Decapping occurs when Poly(A) tails are shortened to an oligo(A) length of 12 residues, which is the minimum required for PABP binding. Two proteins, Edc1 and Edc2, are found to bind to mRNA and to stimulate the activity of the decapping reaction [16]. Decapping takes place mainly in cytoplasmic foci termed P-bodies, which contained several enzymes involved in mRNA degradation including deadenylation of mRNA [17]. Poly(A) tail can serve as an inhibitor of mRNA decapping and degradation. Indeed, mRNAs are prevented from entry in P-bodies and/or are recruited from P-bodies when PABP is bound to the Poly(A) tail [15].

In the present study, we report an analysis of the 5' cap and the Poly(A) tail length influence on the protein expression upon mRNA transfection of dendritic cells. Most of the investigations were performed with the mRNA of luciferase and the transfection was carried out with cationic lipids.

## Materials and methods

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise.

**Plasmids.** pGEM-4Z/EGFP/A64 plasmid [18] encoding the green fluorescent protein (EGFP) and pGEM-4Z/MART-1/A64 plasmid encoding MART-1 antigen both under the T7 RNA polymerase promoter of  $\lambda$ -bacteriophage were kindly given by Dr. P. Ponsaerts (University of Antwerp, Antwerpen, Belgium) and Dr. K. Thielemans (Medical School of the Vrije Universiteit Brussel, Brussel, Belgium), respectively. pCMV2Luc

plasmid (Dr. A. Legrand, CNRS Orléans, France) encoded the firefly luciferase gene under control of the promoter of the human cytomegalovirus (CMV). pCMV2Luc and pGEM-4Z/EGFP/A64 were digested with *SacI* and then with *HindIII* to remove the Luc and the EGFP nucleotide sequence. The digested pGEM-4Z/EGFP/A64 plasmid and the Luc nucleotide sequence were purified. The Luc nucleotide sequence was then inserted into pGEM-4Z/A64 by ligation with the T4 DNA ligase to give pGEM-4Z/LUC/A64. pMART-1 plasmid, Melan-A cDNA cloned in pcDNA1/Amp vector, was kindly given by Dr. P. Coulie (Catholic University of Louvain, Bruxelles, Belgium).

**In vitro mRNA transcription.** pGEM-4Z/LUC/A64 and pGEM-4Z/MART-1/A64 plasmids were linearized with *NdeI*. They were purified using PCR purification kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) and used as templates for in vitro transcription. CAP-mRNA containing a Poly(A) tail of 64 adenosines (A64) was obtained after transcription with the T7 ribomax kit (Promega, Southampton, UK) and capped with m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G (Promega). ARCA-mRNA (anti-reverse cap analogue) was obtained after transcription with the mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion, Oxfordshire, UK) allowing a capping with 3'-O-methyl m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G. Polyadenylation was performed with the Poly(A) tailing kit (Ambion). The number of adenosine residues contained in the Poly(A) tail determined using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP as described by the manufacturer was found to be 100. Purification of mRNA was performed by DNase I digestion, followed by a phenol/chloroform/isoamyl alcohol and a chloroform extraction, a precipitation in isopropanol, and a washing in 70% ethanol. mRNA was solubilized in RNase free water and the quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis upon mRNA denaturation at 65 °C for 10 min. The mRNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm using 1 UA = 40  $\mu$ g/ml. mRNA was stored at -80 °C in small aliquots in polypropylene cryotubes.

**JAWSII cells.** JAWSII cells (ATCC CRL-11904), a p53<sup>-/-</sup> immortalized C57BL/6 bone marrow-derived dendritic cell line [19], were grown in RPMI medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies), 100 U/ml penicillin (Life Technologies), 100 U/ml streptomycin (Life Technologies), and 0.5 ng/ml mouse recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Cells were grown at 37 °C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were mycoplasma free as evidenced by bis-benzimidazole (Hoechst 33258, Molecular Probes) [20]. Two days prior to transfection, cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells/well in 1 ml culture medium in a 24-well plate. At the time of the transfection, cell cultures were 80% confluent and lipofection was performed as described below.

**Human dendritic cells.** Mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup>-cells were purified from leukapheresis products collected from patients after stem-cell mobilization with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)/cyclophosphamide as described [21]. CD34<sup>+</sup> cells were cultured in RPMI medium containing 10% human AB serum (hABS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin, 50 ng/ml insulin-like growth factor (IGF-1, Valbiotech, Paris, France), 50 ng/ml basic fibroblast growth factor (b-FGF, Pepro Tech, London, England), 300 ng/ml Fms like tyrosine 3 kinase Ligand (Flt3-ligand, Immunex, Seattle, WA, USA), 300 ng/ml stem cell factor (SCF, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), 100 U/ml interleukin-3 (Genzyme, Cambridge, MA, USA), and 100 U/ml interleukin-6 (a gift from Dr. L. Aarden, Amsterdam, The Netherlands). At day-5, medium was changed and cells were differentiated into DC in RPMI medium containing 10% hABS, 100 ng/ml GM-CSF (Schering Plough, Levallois-Perret, France), 50 ng/ml Flt3-ligand, 300 ng/ml SCF, 50 ng/ml interleukin-4 and 5 ng/ml tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Genzyme, specific activity  $1.6 \times 10^8$  U/mg). Immature DC (iDC) were obtained at day-10 of culture. In some experiments, 250 ng/ml trimeric CD40-Ligand (Immunex) was added to the culture at day-10 in order to obtain mature DC (mDC) at day-13. Characterization and immunophenotyping of iDC and mDC was monitored by flow cytometry on the expression of HLA-DR, CD80, CD86, CD83, and CD40 antigens. iDC and mDC were transfected at day-10 and day-13 of culture, respectively (see below).



**Transfections and luciferase measurement.** Twelve microliters LipofectAMINE (1 mg/ml, Invitrogen, Gergy Pontoise, France) was prepared in 400  $\mu$ l serum-free RPMI. After 15 min at room temperature, 5  $\mu$ g mRNA or DNA in 400  $\mu$ l serum-free RPMI was added to liposomes. After 15 min at room temperature, 200  $\mu$ l of serum-free RPMI was added. The medium of the cells was discarded and the cells were washed with serum-free RPMI. Lipoplexes (500  $\mu$ l) was then added to the cells and the incubation was performed for 4 h at 37 °C. Then, the medium was discarded, replaced by 500  $\mu$ l of RPMI containing 10% FCS, and the cells were further incubated for 4 h at 37 °C. When indicated, Poly(A) chains in the range of 15–600 residues free or complexed with LipofectAMINE were added to mRNA lipoplexes. The luciferase gene expression was measured by monitoring the luminescence activity according to [22,23]. Measurements of each well were done in duplicate. The luciferase activity was expressed as the number of relative light units (RLU) measured in transfected cells minus that measured in non-transfected cells per milligram of proteins. The amount of proteins in a cell lysate expressed as milligram bovine serum albumin was determined by modified bicinchoninic acid colorimetric assay [24,25]. RLU were converted into luciferase amount. In our conditions, one microgram of purified *firefly* luciferase gave  $10^8$  RLU/4 s.

**MART-1 detection.** Twenty-four hours after transfection with MART-1 mRNA or MART-1 DNA, cells were harvested with PBS containing 0.2 M EDTA, washed in PBS, and fixed for 30 min at –20 °C in 1 ml of a cold methanol/PBS mixture (9:1; v/v). After washing and coating for 30 min at 20 °C with PBS containing 1% BSA, cells were incubated for 20 min at 20 °C with PE-labelled anti-Melan-A antibodies diluted 10 times (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) in 100  $\mu$ l PBS containing 1% BSA. Then, the cells were washed and their fluorescence intensity was measured by flow cytometry upon excitation at 488 nm and emission at 585 nm.

**Statistical analysis.** Statistical comparisons were performed by Student's *t* test for two groups with Statview software (StatView software, Carry, NC, USA).

## Results

The major inconvenient use of mRNA is its high sensitivity to RNase digestion: it can be degraded in few seconds. Condensation of mRNA with cationic lipids led to a formulation, which not only protects mRNA against RNase degradation in the extracellular medium for several hours but also increases its cellular uptake. First, the optimal cationic lipids to mRNA weight ratio for the transfection of JAWSII cells was determined by varying the amount of LipofectAMINE (LF) with 5  $\mu$ g Luc-mRNA (CAP-A64) and the luciferase activity was measured after 7 h of transfection. The luciferase activity in transfected cells measured by luminescence, which is proportional to the luciferase concentration, reflected the amount of luciferase in transfected cells. The highest level of luciferase was obtained with 12  $\mu$ g LF (data not shown). This ratio (12  $\mu$ g of LF to 5  $\mu$ g of mRNA) was used for all further transfections reported here. It is usually advised to denature mRNA before transfection. In our case, we found that heating Luc-mRNA at 65 °C before the lipoplexes formation had no effect on the level of luciferase expression obtained upon lipofection (data not shown). No heating treatment of mRNA was performed for all further transfections reported here.

### Influence of the cap and the Poly(A) tail length *in cis*

Cytoplasmic mRNA contains a cap structure [m7G (5') ppp (5') N, where N is any nucleotide] at its 5' terminus.

Previous reported data had clearly indicated that the cap structure is required for efficient mRNA lipofection [8]. Conventional *in vitro*-synthesis of mRNA capping with m7<sup>5'</sup>Gppp<sup>5'</sup>G (CAP) led to incorporation of one-third to half of caps in the reverse orientation which are not recognized by eIF4E factor [26]. Recently, it has been shown that the use of 3'-O-methyl-m7<sup>5'</sup>Gppp<sup>5'</sup>G, an anti-reverse cap analogue (ARCA), avoided the cap incorporation in the reverse orientation [27]. Consequently, *in vitro* ARCA-capped transcripts (ARCA-mRNA) were found to exhibit translation efficiency higher than that of CAP-capped transcripts (CAP-mRNA) in a rabbit reticulocyte lysate [27]. Therefore, it is expected that luciferase expression in cells transfected with ARCA-Luc-mRNA will also be more efficient. As shown in Fig. 1, the luciferase activity was 15- to 25-fold higher with ARCA-capped Luc-mRNA (ARCA-A100 and ARCA-A64) than with CAP-capped Luc-mRNA (CAP-A100 and CAP-A64).

It is known that cytoplasmic mRNA of eukaryotic cells contains a tail of 100–250 adenosine residues [Poly(A) tail] at its 3' terminus, which is involved in the mRNA translation and stability. Therefore, the luciferase level upon transfer of CAP- or ARCA-mRNA having different Poly(A) lengths was also assessed. We compared the effect of the addition of 100A vs. 64 A in 3' end. The luciferase level in JAWSII cells transfected with CAP-A100 was 25-fold higher than with CAP-A64 and with ARCA-A100 50-fold higher than with ARCA-A64 (Fig. 1). The absence of statistical difference between the luciferase level upon lipofection with ARCA-A64 and CAP-A100 suggested that the effect of the Poly(A) tail length of CAP-A100 was balanced by the higher amount of mRNA with a right oriented cap in ARCA-A64. The transfection with ARCA-A100 was 25-fold higher than with CAP-A100, and 700-fold higher than with CAP-A64. The pattern of the luciferase

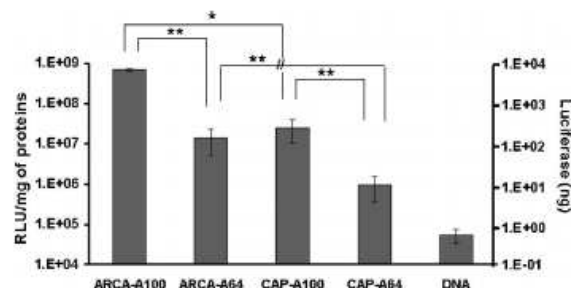


Fig. 1. Influence of the capping and of the Poly(A) length *in cis*. JAWSII cells were incubated for 4 h with either ARCA-capped Luc-mRNA containing a 64 A (ARCA-A64) or 100 A (ARCA-A100) or CAP-capped Luc-mRNA containing 64 A (CAP-A64) or 100 A (CAP-A100) Poly(A) tail. mRNA (2.5  $\mu$ g) was complexed with 6  $\mu$ g LF. JAWSII cells were also incubated with 2.5  $\mu$ g of the plasmid DNA encoding the luciferase gene under the control of the CMV promoter complexed with 6  $\mu$ g LF (DNA). The luciferase activity expressed as RLU/mg of protein was measured 4 h (24 h for DNA) later. The average values (means  $\pm$  SD) from three different experiments each carried out in triplicate are shown. Statistical analysis was performed (\*\* *P* < 0.05 and \* *P* < 0.1).



level in human hepatocarcinoma (HepG2) cells and human epithelial ovary carcinoma (HeLa) cells vs. the design of the mRNA transcript was similar to that obtained in JAWSII cells (data not shown). The luciferase activity with ARCA-A100 Luc-mRNA was  $\sim 3 \times 10^8$  and  $\sim 6 \times 10^7$  in HeLa and HepG2 cells, respectively. So, non-denatured ARCA-A100 Luc-mRNA was found to be the best mRNA construct for luciferase and thus will be used for all further transfections reported here. It is noticeable that whatever the mRNA transcripts used, mRNA-based transfection gave more luciferase than DNA-based transfection. It was 12,000-fold higher upon transfection with ARCA-A100 Luc-mRNA than with the plasmid DNA encoding the luciferase gene (Fig. 1).

#### Kinetics of the luciferase expression in JAWSII cells

We determined the luciferase activity as a function of time and ARCA-A100 Luc-mRNA concentration. As shown in Fig. 2, luciferase was already detected as soon as 1 h and was maximal at 8 h in JAWSII cells upon lipofection. It was 20-fold lower at 4 h than at 8 h and then, it decreased and was 20-fold lower at 30 h. This kinetic was similar when cells were transfected with the CAP-A64 mRNA transcript but the luciferase level was lower (data not shown). Fig. 2 inset shows that the luciferase activity reached a plateau with 2.5  $\mu$ g Luc-mRNA.

#### Free Poly(A) chains in trans enhance the luciferase level

Clearly, the Poly(A) tail length seemed to be a critical element for efficient expression of the protein upon mRNA lipofection. Unfortunately, we did not succeed to elongate the Poly(A) tail of the Luc-mRNA transcript up to 100 adenosines by increasing either the polyadenylation reaction time or the amount of Poly(A) polymerase. Moreover, further polyadenylation performed with purified ARCA-

A100 Luc-mRNA did not also elongate the Poly(A) tail. Borman et al. [28] showed that the addition of exogenous Poly(A) chains of 50–180 residues *in trans* in ribosome-depleted rabbit reticulocyte lysates stimulated 11-fold the translation of capped mRNA containing a 100 adenosine residue Poly(A) tail. As demonstrated by Borman et al., Poly(A) can stimulate *in vitro* capped mRNA translation *in trans* without the need of mRNA circularization. Therefore, we wondered whether the addition of a commercial Poly(A) preparation—Poly(A) chains in the range of 15–600 residues, present in roughly equimolar quantities—could increase the protein level. As shown in Fig. 3, the luciferase activity was 2.3-fold higher when JAWSII cells were co-transfected with ARCA-A100 Luc-mRNA complexed with LF and 8.5  $\mu$ g Poly(A) chains complexed with LF (at a Poly(A) to mRNA weight ratio of 3.4). An enhancement was also obtained when the cells were transfected with a mixture of ARCA-A100 Luc-mRNA and 17  $\mu$ g Poly(A) chains complexed with LF (at a Poly(A) to mRNA weight ratio of 6.8). Comparatively, Borman et al., obtained a translation activation of only 1.4-fold in standard rabbit reticulocyte lysates. Therefore, mRNA lipofection can be improved by co-transfection with exogenous Poly(A) chains complexed with LF. The gain in the protein expression was abolished at higher Poly(A) to mRNA ratio and when free Poly(A) chains were not complexed with LF.

#### Enhanced luciferase expression in human dendritic cells using ARCA-A100 mRNA-Luc

We wondered whether the ARCA-A100 Luc-mRNA transcript also led to high luciferase activity into immature (iDC) and mature (mDC) human dendritic cells comparatively to ARCA-A64, CAP-A100 or CAP-A64 Luc-mRNA. As in the case of JAWSII cells, the luciferase activity was higher with ARCA-A100 Luc-mRNA (Fig. 4). It was 4-fold higher in mDC than in iDC. The luciferase

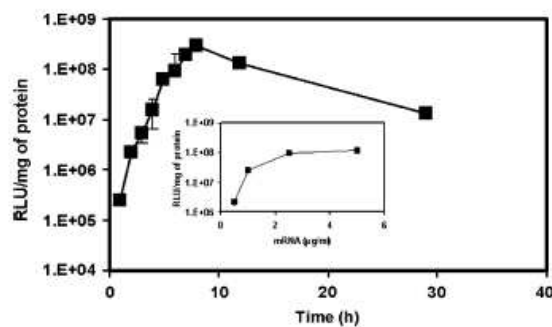


Fig. 2. Time course of the luciferase expression upon Luc-mRNA lipofection. JAWSII cells were incubated for 4 h with 2.5  $\mu$ g Luc-mRNA (ARCA-A100) complexed with 6  $\mu$ g LF. The luciferase activity expressed as RLU/mg of protein was measured over 26 h post-lipofection. Inset: luciferase expression vs. mRNA concentration. The luciferase activity was measured 4 h later. The average values (means  $\pm$  SD) from three different experiments are shown.

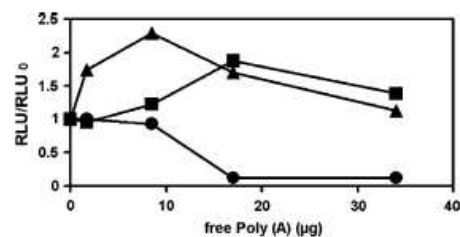


Fig. 3. Co-lipofection with Poly(A) chains *in trans* increased luciferase expression. JAWSII cells were incubated for 4 h with either (▲) 2.5  $\mu$ g ARCA-A100 Luc-mRNA complexed with 6  $\mu$ g LF and Poly(A) chains complexed with 6  $\mu$ g LF, (■) a mixture of 2.5  $\mu$ g ARCA-A100 Luc-mRNA and of Poly(A) chains complexed with 6  $\mu$ g LF or (●) 2.5  $\mu$ g ARCA-A100 Luc-mRNA complexed with 6  $\mu$ g LF and free Poly(A) chains. The luciferase activity was measured 4 h later. Data are expressed as RLU/RLU<sub>0</sub> where RLU<sub>0</sub> and RLU are the luciferase activity measured in the absence and the presence of Poly(A) chains, respectively. Data shown are representative values from experiments carried out in triplicate.

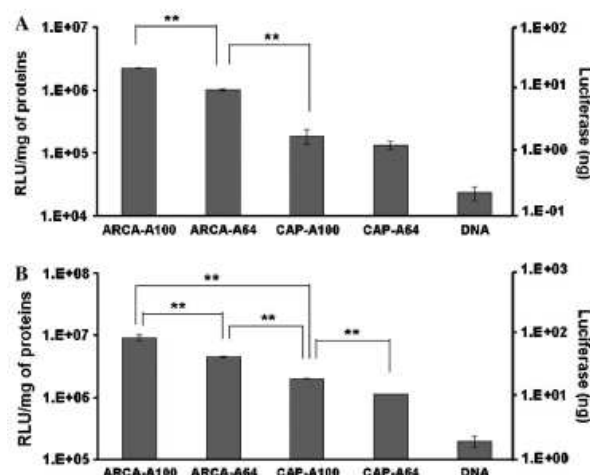


Fig. 4. Luc-mRNA lipofection of human (iDC) immature and (mDC) mature dendritic cells. (A) iDC and (B) mDC were incubated for 4 h with either ARCA-capped Luc-mRNA containing a 64 A (ARCA-A64) or 100 A (ARCA-A100) or CAP-capped Luc-mRNA containing 64 A (CAP-A64) or 100 A (CAP-A100) Poly(A) tail. mRNA (5  $\mu$ g) was complexed with 12  $\mu$ g LF. JAWSII cells were also incubated with 5  $\mu$ g of the plasmid DNA encoding the luciferase gene under the control of the CMV promoter complexed with 12  $\mu$ g LF (DNA). The luciferase activity expressed as RLU/mg of protein was measured 4 h (24 h for DNA) later. The average values (means  $\pm$  SD) from three different experiments each carried out in triplicate are shown. Statistical analysis was performed (\*\* $P$  < 0.05).

activity in iDC and mDC transfected with ARCA-A100 was only 2-fold higher than with ARCA-A64. It was 12- and 2-fold higher than with CAP-A100 in iDC and mDC, respectively. The luciferase activity in iDC and mDC was 130- and 30-fold lower than in JAWSII cells, respectively. This is in agreement with the fact that lipofection of primary human cells is usually less efficient than lipofection of cultured cells. Each type of mRNA transcript gave much more modest differences than in the case of JAWSII cells. The lower level of luciferase could conceal the benefit of the ARCA-A100 mRNA transcript over the other transcripts. Moreover, a higher intracellular digestion of the mRNA in the primary cells as well as a faster turnover of mRNA could also explain the modest differences between each type of mRNA transcript. Nevertheless, the highest level of luciferase in iDC and mDC was obtained with the ARCA-A100 transcript. As for JAWSII cells, mRNA-based transfection gave a better luciferase expression whatever the mRNA transcripts used than DNA-based transfection. Using ARCA-A100 Luc-mRNA, luciferase expression level was 100- and 40-fold higher in iDC and mDC, respectively, than with the plasmid DNA encoding the luciferase gene (Fig. 4).

#### Lipofection with MART-1 mRNA

We wanted to check if the results obtained with the mRNA transcript of luciferase could be extended to other

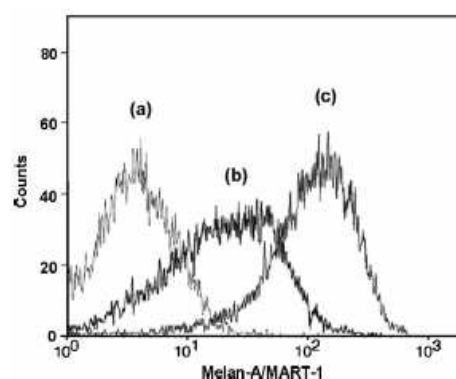


Fig. 5. MART-1 mRNA lipofection. JAWSII cells were incubated for 4 h with 2.5  $\mu$ g (a) Luc-mRNA (ARCA-A100) or ARCA-capped MART-1 mRNA containing either (b) a 64 A or (c) a 100 A Poly(A) tail. Twenty-four hours after the transfection, MART-1 expression in methanol fixed cells was measured by flow cytometry upon staining with PE-labelled anti-Melan-A antibodies. The histograms shown are representative of one experiment carried out in triplicate.

proteins. For this purpose, we used the mRNA of the human melanoma tumor antigen MART-1 (MelanA) that presents therapeutic interest to generate anti-melanoma cellular vaccine [5]. In addition, MART-1 is totally different from luciferase. Its mRNA transcript contains 860 nucleotides instead of 1900 for luciferase and the MART-1 protein is an endoplasmic membrane protein while luciferase is a soluble cytoplasmic protein. Lipofection of JAWSII cells was carried out with either ARCA-A100 or ARCA-A64 MART-1-mRNA. As shown in Fig. 5, MART-1 expression was much more higher with ARCA-A100 than with the ARCA-A64. The number of MART-1 expressing cells and the level of the protein expression were both higher ( $95 \pm 2\%$ ; mean of fluorescence intensity of 66) with ARCA-A100 than with ARCA-A64 ( $85 \pm 3\%$ ; mean of fluorescence intensity of 14). Therefore, the optimized mRNA construct described for luciferase, a protein reporter, can be used for other proteins of interest. Comparatively, no MART-1 antigen was detected upon lipofection with the plasmid DNA encoding the MART-1 gene (data not shown).

#### Discussion

Data reported in this work indicate that dendritic cells transfected with the mRNA of luciferase expressed a high luciferase level when the mRNA was 5' terminus capped and when its 3' terminus contained a Poly(A) tail of 100 adenosine residues. ARCA-mRNA capped using 3'-O-methyl-m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G instead of m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G allowing 100% of capping with the right orientation have been shown to exhibit higher translation efficiency in a rabbit reticulocyte lysate [27]. We found also that the luciferase activity into a mouse dendritic cell line (JAWSII cells) was higher with the ARCA-mRNA version than the CAP-mRNA one. This gain of efficiency due to



ARCA-capping was also confirmed in human dendritic cells as well as in HepG2 and HeLa cell lines. Moreover, we showed that a A100 Poly(A) tail was better than a A64 Poly(A) tail, and thus even in a 5'cap-mRNA context. This seems to be in agreement with the fact that the length of Poly(A) tail found in cytoplasmic mRNA of eukaryotic cells comprises 100–250 adenosine residues. This gain of efficiency due to A100 Poly(A) was also confirmed in human dendritic cells as well as in HepG2 and HeLa cell lines. The luciferase activity was maximal at 8 h and then decreased 20-fold over 30 h. This kinetic expression in JAWSII cells was similar to that reported for Luc-mRNA transfection using DOTAP in B16-F10 mouse melanoma cells [29] and human breast cancer cells [30] as well as in human osteocarcinoma cells [31] and human dendritic cells [32] using lipofectin. According to the luciferase half-life, which is about 3 h [33], the detection of a luciferase activity 30 h post-transfection suggests that the lifetime of Luc-mRNA was relatively long or the Luc-mRNA was released progressively from lipoplexes.

The co-transfection of Poly(A) chains *in trans* with ARCA-A100 Luc-mRNA showed an increase of the luciferase level. This result might suggest that mRNA circularization via the Poly(A) tail and the cap is not always involved in the increase of the mRNA translation. One explanation of this effect might be the role of Poly(A) in the mRNA stability rather than in the synergistic translation activation with cap. The binding of PABP molecules on free Poly(A) chains increases the binding of multimerized PABP to eIF4G and the affinity of eIF4E for the 5' cap. The presence of free Poly(A) chains could protect mRNA from degradation by balancing the deadenylation of the 3' Poly(A) tail and then the cleavage of the 5' cap structure or the 5'–3' exonucleotidic digestion. Translated and degraded pools of mRNA are spatially distinct in the cytoplasm. Translation occurs in polysomes whilst mRNA degradation occurs mainly in cytoplasmic foci termed P-bodies. PABP bound to Poly(A) could also serve as an inhibitor of mRNA decapping via the 5' terminus by preventing its entry in P-bodies or its recruitment from P-bodies where decapping takes place [15,17]. An increase of mRNA recruitment in polysomes via PABP bound to Poly(A) could also explain the enhancement of the level of the protein expression. The gain in the protein expression was abolished when the Poly(A) to mRNA ratio was higher than 6.8. This was in agreement with Borman's results showing that the *in vitro* translation stimulation was reduced when the Poly(A) to mRNA weight ratio was higher than 10 [28]. Moreover, there was no gain when free Poly(A) chains were not complexed with LF. These results could be due to either a dilution of the number of PABP molecules bound per Poly(A) chains by the excess of Poly(A) chains leading to a reduction of the affinity for the IeIF4G factor or a dissociation of Luc-mRNA/LF complexes in the presence of an excess of free Poly(A) chains leading to a decrease in the amount of Luc-mRNA taken up by the cells.

mRNA-based transfection in DC was found more efficient than DNA-based transfection with the plasmid DNA encoding the corresponding gene, whatever the mRNA transcripts used. This mostly comes from the poor nuclear gene delivery in the absence of cell division where the transcription occurs. In contrast, the translation occurring in the cytosol, mRNA-based transfection does not require the nuclear machinery. Comparatively, in highly dividing cells as HeLa cells, the transfection with the pCMVLuc plasmid DNA gave a luciferase activity of  $1 \times 10^8 \pm 4 \times 10^6$  RLU/mg protein which was close to that obtained with ARCA-A100 Luc-mRNA ( $3.6 \times 10^8$  RLU/mg protein).

In conclusion, we optimized a mRNA construct (ARCA-A100 mRNA) allowing an efficient luciferase and MART-1 expression upon lipofection of dendritic cells. ARCA-A100 mRNA of MART-1 will be useful to load DC with this tumor antigen to stimulate an anti-melanoma immune response. However, optimal mRNA transfection requires also an efficient mRNA delivery. This concerns its release from the vehicle and its transport at the right place in the cytosol. Indeed, Poly(A) has been shown to localize preferentially with microfilaments [34,35]. Intracellular trafficking and location of mRNA upon transfection will undoubtedly provide useful informative data.

#### Acknowledgments

We express our gratitude to Dr. L. Landemar (Agrobio, La Ferté Saint Aubin, France) for JAWSII cells. This work was supported by grants from Agence Nationale de Recherches sur le Sida (ANRS) and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). M. Mockey and F.P. Dupuy were financially supported by a "Ministère de l'Enseignement, de la Recherche et de la Technologie Française" and ANRS, respectively.

#### References

- [1] J.F. Arthur, L.H. Butterfield, M.D. Roth, L.A. Bui, S.M. Kiertscher, R. Lau, S. Dubinett, J. Glaspy, W.H. McBride, J.S. Economou, A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells, *Cancer Gene Ther.* 4 (1997) 17–25.
- [2] S.S. Diebold, M. Kurs, E. Wagner, M. Cotten, M. Zenke, Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19087–19094.
- [3] S.S. Diebold, H. Lehrmann, M. Kurs, E. Wagner, M. Cotten, M. Zenke, Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 775–786.
- [4] I. Strobel, S. Berchtold, A. Gotze, U. Schulze, G. Schuler, A. Steinkasserer, Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes, *Gene Ther.* 7 (2000) 2028–2035.
- [5] B.A. Sullenger, E. Gilboa, Emerging clinical applications of RNA, *Nature* 418 (2002) 252–258.
- [6] S. Pascolo, Messenger RNA-based vaccines, *Expert Opin. Biol. Ther.* 4 (2004) 1285–1294.
- [7] P. Ponsaerts, V.F. Van Tendeloo, Z.N. Berneman, Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells, *Clin. Exp. Immunol.* 134 (2003) 378–384.

- [8] R.W. Malone, P.L. Felgner, I.M. Verma, Cationic liposome-mediated RNA transfection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6077–6081.
- [9] M. Wakiyama, T. Futami, K. Miura, Poly(A) dependent translation in rabbit reticulocyte lysate, *Biochimie* 79 (1997) 781–785.
- [10] A.K. Banerjee, 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids, *Microbiol. Rev.* 44 (1980) 175–205.
- [11] R.J. Jackson, Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3' untranslated region, *Cell* 74 (1993) 9–14.
- [12] A.B. Sachs, P. Sarnow, M.W. Hentze, Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes, *Cell* 89 (1997) 831–838.
- [13] A.C. Gingras, B. Raught, N. Sonenberg, eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 913–963.
- [14] D.R. Gallie, A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation, *Gene* 216 (1998) 1–11.
- [15] J. Collier, R. Parker, Eukaryotic mRNA decapping, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 861–890.
- [16] D. Schwartz, C.J. Decker, R. Parker, The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme, *RNA* 9 (2003) 239–251.
- [17] U. Sheth, R. Parker, Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies, *Science* 300 (2003) 805–808.
- [18] A. Heiser, P. Dahm, D.R. Yancey, M.A. Maurice, D. Boczkowski, S.K. Nair, E. Gilboa, J. Vieweg, Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro, *J. Immunol.* 164 (2000) 5508–5514.
- [19] E.A. Butz, M.J. Bevan, Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells, *J. Immunol.* 160 (1998) 2139–2144.
- [20] T.R. Chen, In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain, *Exp. Cell Res.* 104 (1977) 255–262.
- [21] F.P. Dupuy, E. Mouly, M. Mesel-Lemoine, C. Morel, J. Abriol, M. Cheraï, C. Baillou, D. Negre, F.L. Cosset, D. Klatzmann, F.M. Lemoine, Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters, *J. Gene Med.* 7 (2005) 1158–1171.
- [22] J.R. de Wet, K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, S. Subramani, Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 725–737.
- [23] C. Pichon, E. LeCam, B. Guerin, D. Coulaud, E. Delain, P. Midoux, Poly[Lys-(AEDTP)]: a cationic polymer that allows dissociation of pDNA/cationic polymer complexes in a reductive medium and enhances polyfection, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 76–82.
- [24] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [25] H.D. Hill, J.G. Straka, Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents, *Anal. Biochem.* 170 (1988) 203–208.
- [26] A.E. Pasquinelli, J.E. Dahlberg, E. Lund, Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases, *RNA* 1 (1995) 957–967.
- [27] J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, R.E. Rhoads, Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG, *RNA* 7 (2001) 1486–1495.
- [28] A.M. Borman, Y.M. Michel, C.E. Malnou, K.M. Kean, Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 36818–36824.
- [29] T. Bettinger, R.C. Carlisle, M.L. Read, M. Ogris, Seymour LW, Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 3882–3891.
- [30] D. Lu, R. Benjamin, M. Kim, R.M. Conry, D.T. Curiel, Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors, *Cancer Gene Ther.* 1 (1994) 245–252.
- [31] K. Kariko, A. Kuo, E.S. Barnathan, D.J. Langer, Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA, *Biochim. Biophys. Acta* 1369 (1998) 320–334.
- [32] D. Weissman, H. Ni, D. Scales, A. Dude, J. Capodici, K. McGibney, A. Abdool, S.N. Isaacs, G. Cannon, K. Kariko, HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response, *J. Immunol.* 165 (2000) 4710–4717.
- [33] J.F. Thompson, L.S. Hayes, D.B. Lloyd, Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation, *Gene* 103 (1991) 171–177.
- [34] C.J. Decker, R. Parker, Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 386–392.
- [35] D. St Johnston, Moving messages: the intracellular localization of mRNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 363–375.

**Transfection des cellules dendritiques humaines par des complexes ARNm/vecteur histidylés.**

# Transfection des cellules dendritiques humaines par des complexes ARNm/vecteur histidylé

## Introduction

Actuellement, la technique la plus efficace pour le transfert *in vitro* d'ARNm codant des antigènes tumoraux dans les cellules dendritiques (DCs) est l'électroporation. Cependant cette méthode est difficilement applicable à grande échelle. Des vecteurs non viraux efficaces qui lèveraient en partie cette contrainte technique sont donc activement recherchés. A l'exception du Transmessenger Transfection Reagent (Qiagen) qui permet une transfection de 40 à 50% des DCs matures [1], il a été montré que les polymères cationiques tels que la PEI branchée (25kDa), l'ExGen 500 et le SuperFect, induisent une très forte toxicité sur ce type de cellules, les rendant actuellement ces vecteurs inutilisables [2]. Les vecteurs lipidiques, tels que le DOTAP [3, 4], le TransFast [5] ou encore la lipofectAMINE [6], se sont révélés moins toxiques, mais ne permettent pas d'induire une expression protéique du transgène dans les DCs comparable à celle obtenue par électroporation [5, 7, 8]. Des polymères et des lipides cationiques histidylés apparaissent potentiellement intéressants pour le transfert d'ARNm d'antigènes tumoraux. En effet, ces molécules semblent particulièrement adaptées à la délivrance des molécules d'ARNm dans le cytosol de par leur propriété fusiogène vis-à-vis des membranes cellulaires à pH acide. De plus, des travaux antérieurs ont montrés que ces vecteurs n'induisent qu'une faible cytotoxicité [9, 10].

Au cours de ce travail, nous avons optimisé les conditions de culture durant la transfection des DCs humaines matures afin de limiter la toxicité de l'opération. Puis nous avons testé deux types de vecteurs cationiques histidylés, le polymère PEI-HIS et les liposomes HDHE :Cho pour le transfert de l'ARNm MART1 dans les DCs humaines. Cet ARNm a été vectorisé sous forme de polyplexe (ARNm/polymère), de lipoplexes (ARNm/liposomes) et de lipopolyplexes (ARNm/polymère/liposomes) et l'efficacité de transfection a été analysée pour différents rapports massiques des partenaires. Les résultats obtenus indiquent que le polymère PEI-HIS est un bon vecteur. Ils confirment également que les DCs immatures ne sont pas transfectées, ce qui peut être relié à un trafic intracellulaire différent de celui rencontré dans les DCs matures.

## MATERIEL et METHODES

Sauf si mentionné, l'ensemble des produits utilisés provenaient de Sigma (St Quentin Fallavier, France).

### Cellules dendritiques humaines

Des monocytes du sang périphérique CD14<sup>+</sup> nous ont été fournis par le Pr. Pascale Jeannin (INSERM U564, Angers) et le Dr Marc Grégoire (INSERM U419, Nantes). Ils sont préalablement purifiés par élutriation sur colonne CD14 (Miltényi Biotec, Paris, France). Pour cela, les cellules du sang périphérique sont incubées avec des billes couplées à l'anticorps anti-CD14 aimantées puis chargées sur une colonne placée dans un séparateur magnétique. Les cellules CD14<sup>+</sup> marquées magnétiquement sont retenues sur la colonne. Celle-ci est ensuite retirée du champ pour éluer les cellules. Après réception, les monocytes purifiés sont mis en culture à l'étuve (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) dans des plaques 24 puits traitées avec 300 µl de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) dans l'éthanol. Les cellules sont distribuées à raison de 10<sup>6</sup> cellules dans 1ml un milieu RPMI contenant de la glutamine (2mM), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml), 1% Pyruvate de sodium, 10% de sérum de veau foetal décomplémenté et différents facteurs de croissance et cytokines :

- pour la phase de différenciation (4 jours): GM-CSF humain (20 ng/ml, R&D Systems, Lille, France) et IL-4 humain (20 ng/ml, R&D) (milieu hDCs complet)
- pour la phase de maturation (2 jours) : GM-CSF humain (20ng/ml), IL-4 humain (20 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml, R&D), poly I:C (50 µg/ml, R&D).

Le traitement des boîtes de culture au poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) empêche l'adhésion des DCs sur le plastique. Les DCs matures sont récupérées et lavées au PBS puis comptées sur cellules de Malassez à l'aide de bleu trypan.

La proportion de DCs matures est évaluée en cytométrie en flux par l'absence du marquage CD1a dont l'expression est spécifique des DCs immatures. Brièvement, les cellules sont lavées et traitées au PBS contenant 1% de SAB pour réduire l'adsorption non spécifique des anticorps. Les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 30 min avec 5 µl d'anticorps anti-CD1a couplé à la phycoérythrine (clone HI149, BD Pharmingen, San Diego, CA). Les cellules sont lavées et reprises dans 400 µl de liquide de gaine (PBS, NaF 15.4 mM et phénoxyéthanol 0.2%). L'intensité de fluorescence est mesurée par cytométrie en flux après excitation de 488 nm et émission à 585 nm. Le nombre de DCs matures est estimé en comptant le nombre de cellules dépourvues de CD1a.

### Plasmides

Le plasmide pGEM-4Z/LUC/A64 codant le gène de la luciférase de la luciole sous le contrôle du promoteur de la ARN-polymérase T7 du bactériophage λ, a été construit à partir



du plasmide pCMV2Luc (Dr. A. Legrand, CNRS Orléans, France) comme précédemment décrit [11].

Le plasmide pGEM-4Z/MART-1/A64 codant pour l'antigène MART-1, nous a été gracieusement fourni par le Dr. K. Thielemans (Ecole de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles VUB, Bruxelles, Belgique).

### **Polymère PEI-HIS**

Le polyéthylèneimine de 25 kDa (PEI ; Aldrich) est précipité par addition de soude. Le précipité est récupéré par centrifugation, repris dans l'eau et la solution est neutralisée par une solution d'acide para-toluène sulfonique (Tos) à 10% dans l'eau. Après lyophilisation, on obtient une poudre de PEI-Tos parfaitement soluble dans le DMSO. Un certain nombre de fonctions amines primaires est couplé à un résidu histidyle selon le protocole suivant. Le PEI-Tos (100 mg) est dissout dans 5 ml de DMSO et 35 µl de diisopropyléthylamine sont ajoutés. L'histidine [(Boc)<sub>2</sub>His-Osu] (58 mg ; Bachem) protégé sur les fonctions aminées et sous forme d'ester actif est ajoutée à la solution. La réaction de couplage est laissée pendant 24 h à température ambiante. Les fonctions aminées des histidines sont déprotégées par traitement acide pendant une nuit à 4°C après addition de 10 ml d'un mélange eau/acide trifluoroacétique (1/1 ; v:v). Après évaporation partielle, le polymère est précipité avec 100 ml d'acétate d'éthyle. Le précipité est lavé à l'acétate d'éthyle et séché. Après reprise dans l'eau bidistillée, le polymère est dialysé contre de l'eau bidistillée puis lyophilisé. Un dosage colorimétrique par la méthode de Pauli permet de déterminer qu'une molécule de PEI est substituée par 30 résidus histidyles.

### **Liposomes HDHE : Cho**

Un film lipidique est préparé par évaporation à sec d'une solution éthanolique à 5,4 mM en L-histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide (HDHE) et cholestérol (rapport molaire 1:2) [9]. Ce film est hydraté avec 1 ml d'eau stérile RNase-free, mélangé fortement pendant 3 min et conservé 2 h à 4°C. Le mélange est ensuite mélangé fortement et soniqué pendant 15 min à 37 kHz avec un bain à ultrasons (Bioblock Scientific, Illkirch, France).

### **Synthèse in vitro de l'ARNm**

Les ARNm ont été synthétisés comme décrit précédemment [11]. Brièvement, les plasmides pGEM-4Z/LUC/A64 et pGEM-4Z/MART-1/A64 sont linéarisés par *SpeI* (InVitrogen, Cergy Pontoise, France), purifiés puis servent de matrice pour la transcription *in vitro*. Les ARNm ARCA-A64 sont obtenus après transcription à l'aide du kit mMessage mMachine T7 Ultra (Ambion, Oxfordshire, UK) permettant l'ajout d'une coiffe 3'-O-méthyl m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G. La polyadénylation des ARNm ARCA-A64 par le Poly(A) tailing kit (Ambion) abouti à l'obtention des ARNm ARCA-A100. La purification des ARNm est effectuée par digestion à la DNase I, suivie d'une extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis d'une extraction avec du chloroforme seul. Les ARNm sont précipités avec

de l'isopropanol et lavés à l'éthanol 70%. Après séchage, ils sont solubilisés dans de l'eau RNase-free. Leur concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1UA = 40 µg/ml). Leur qualité est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% après dénaturation à 65°C pendant 10 min dans une solution de formaldéhyde. Enfin, ils sont conservés par congélation de petits aliquots à -80°C dans des cryotubes en polypropylène.

Pour les expériences d'internalisation, un marquage de l'ARNm ARCA-LUC-A100 par la fluorescéine a été effectué en utilisant le kit Label IT (fluorescein nucleic acid labeling kit, MIRUS, Madison, WI, USA) conformément au protocole du fournisseur.

### **Evaluation de la toxicité des conditions de culture des hDCs matures**

Après maturation,  $1,5 \times 10^5$  hDCs sont mises dans 1 ml d'OPTIMEM, d'OPTIMEM +10% SVF ou d'OPTIMEM + 2% SAB (serum albumine bovine). Les différents supports testés sont des puits de plaques de culture à 24 puits et des tubes en polypropylène. Ces supports sont traités ou non avec du polyméthacrylate. Après 4h, le milieu est éliminé après centrifugation (5 min, 800g) et les cellules sont incubées dans le milieu hDCs complet pendant 20h à 37°C à l'étuve 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules cultivées dans les puits de plaques de culture non traitées qui adhèrent sur le plastique sont décollées avec la Trypsine/EDTA, puis lavées avant d'être reprises dans 500 µl de liquide de gaine (PBS, NaF 15.4 mM et phénoxyéthanol 0.2%).

La viabilité des DCs est évaluée à 4h et à 24h par cytométrie en flux en présence d'Iodure de propidium (5 ng/ml). La fluorescence des cellules est mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission de 610 nm. Les cellules mortes émettent une fluorescence rouge suite à l'intercalation de l'iodure de propidium dans l'ADN nucléaire après passage de la membrane plasmique fragilisée.

### **Transfection de hDCs matures**

Le jour de la transfection, les hDCs sont récupérées puis lavées avec du PBS et comptées. Les cellules sont ensuite réparties dans des tubes à raison de  $10^6$  cellules par tube.

#### **- Formulation des polyplexes :**

5 µl d'ARNm (1 µg/µl) sont mis dans 200 µl d'OPTIMEM. Le polymère PEI-HIS (1 µg/µl) est mis dans 200µl d'Hépès 10mM, pH 7.4. L'ARNm est déposé goutte-à-goutte sur le polymère et le tout est laissé 30 min à température ambiante. Le volume de la solution de transfection est ajusté à 1 ml avec de l'OPTIMEM.

#### **- Formulation des lipoplexes :**

5 µl d'ARNm (1 µg/µl) sont mis dans 200µl d'OPTIMEM. Les liposomes HDHE : Cho (1 µg/µl) sont mis dans 200 µl d'OPTIMEM puis ajoutés à la solution d'ARNm et le tout est incubés 15 min à température ambiante. Le volume de la solution de transfection est ajusté à 1 ml avec de l'OPTIMEM et la molarité à 150 mM avec une solution aqueuse NaCl 5 M.

- Formulation des lipopolyplexes :

5 µl d'ARNm (1 µg/µl) sont mis dans 70 µl d'OPTIMEM. Le polymère PEI-HIS (1 µg/µl) est mis dans 50 µl d'Hépès 10 mM, pH 7.4. L'ARNm est déposé goutte à goutte sur le polymère et le tout est laissé 30 min à température ambiante. Les liposomes HDHE : Cho (1 µg/µl) sont mis dans 200 µl d'OPTIMEM puis injectés dans les polyplexes et incubés 15 min à température ambiante. Le volume de la solution de transfection est ajusté à 1 ml avec de l'OPTIMEM et la molarité à 150 mM avec une solution aqueuse NaCl 5 M.

Pour chacune des formulations, 500 µl de solution de transfection (soit 2,5µg d'ARNm) sont déposés dans des tubes contenant  $10^6$  hDCs. Après une incubation de 4h à 37°C, le milieu de transfection est éliminé et remplacé par 1 ml de milieu complet, correspondant à du RPMI contenant de la glutamine (2mM) de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml), 10% de SVF, 1% Sodium-Pyruvate, du GM-CSF humain (20 ng/ml) et de l'IL-4 humain (20 ng/ml). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans une étuve à 5% de CO<sub>2</sub>.

**Détection de la protéine MART1**

Après deux lavages dans du PBS, les cellules sont fixées et perméabilisées en reprenant le culot cellulaire dans 1 ml de méthanol/PBS (9/1 ; v :v) à -20°C pendant 30 min. Elles sont ensuite lavées et traitées au PBS contenant 1% de SAB pour réduire l'adsorption non spécifique des anticorps. Les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 30 min avec 5 µl d'anticorps anti-MART1 couplé à la phycoérythrine (clone A103, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Les cellules sont lavées et reprises dans 400 µl de liquide de gaine. L'intensité de fluorescence est mesurée par cytométrie en flux après excitation de 488 nm et émission à 585 nm.

**Internalisation de l'ARNm**

Les hDCs sontensemencées dans des tubes à raison de  $10^6$  cellules par tube puis transfectées à l'aide du polymère PEI-HIS par l'ARNm ARCA-Luc-A100 marqué ou non à la fluorescéine. L'ARNm non marqué étant utilisé comme contrôle. Après 4h d'incubation dans la solution de transfection, les DCs sont traitées à la Trypsine/EDTA qui permet d'éliminer une grande partie des polyplexes fluorescents fixés sur la membrane plasmique. Les hDCs sont ensuite lavées avec du PBS froid, reprises dans 400 µl de liquide de gaine et incubées 30 min à 4°C en présence ou non de monensine (50 µM) [12, 13]. L'intensité de fluorescence est mesurée par cytométrie en flux avec une excitation à 488 nm et une émission à 520 nm.

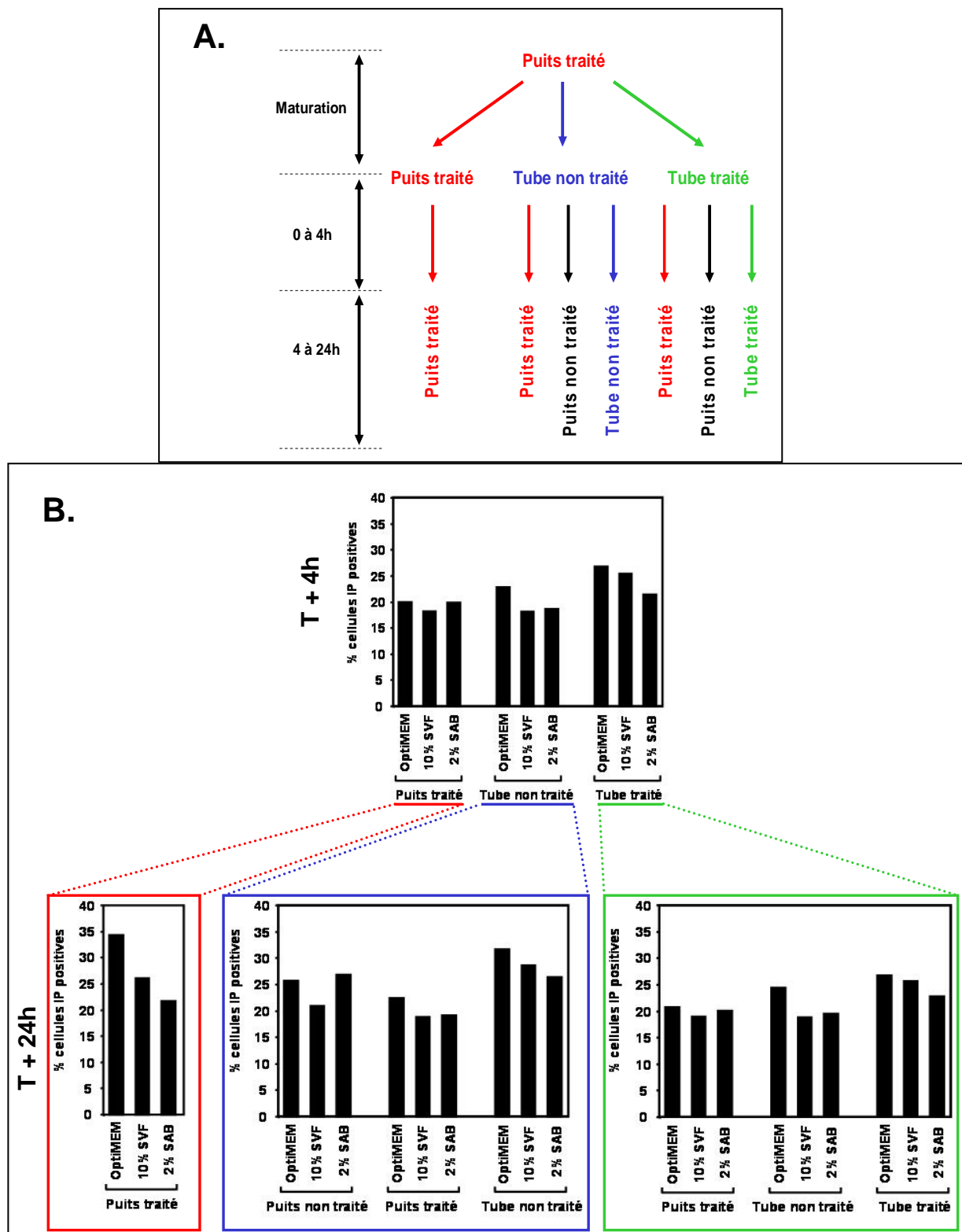
## RESULTATS

### **Influence des conditions de cultures sur la viabilité des DCs humaines.**

La mise en cultures de DCs matures dans des boîtes de culture en plastique traitées au polyméthacrylate évite l'adhésion des cellules, alors qu'elles adhèrent fortement en absence de traitement. En s'affranchissant ainsi d'une étape de décollement de cellules par la trypsine, cette méthode facilite les manipulations ultérieures des hDCs prévues pour être réinjectées chez le patient. Afin d'optimiser et de standardiser ces conditions en vue des transfections, nous avons testé l'influence sur la viabilité des hDCs de différents milieux et supports (tubes ou puits de culture cellulaire) avec ou sans traitement de surface (Figure 1A).

Les résultats présentés dans la Figure 1B ne montrent pas de variation importante entre les différentes conditions testées. Après 4h, le taux le plus faible de cellules positives à l'iodure de propidium (IP), correspondant à des cellules mortes ou non viables, est obtenu pour une incubation dans les puits traités. Ce taux d'environ 20% reste proche de celui le plus élevé observé avec les tubes traités (25%). Après 24h de culture dans du milieu complet, les hDCs incubées au préalable 4h dans l'OPTIMEM seul et sur un support traité avant et après le changement de milieu, présentent le taux de mortalité le plus élevé. On note également comme à 4h, que la présence de SAB ou de sérum diminue d'environ 5% la cytotoxicité. Dans aucune des conditions de culture testées, nous n'avons observé de mortalité cellulaire supérieure à 35%.

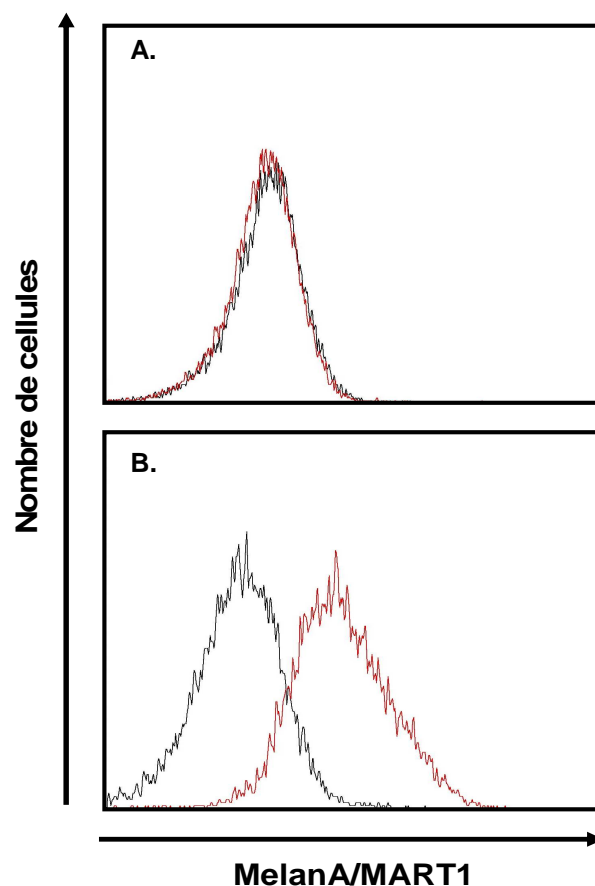
Nous constatons que les conditions de culture en tube non traité avec les cellules dans du milieu OPTIMEM seul pendant 4h, n'engendrent pas, après 24h, de cytotoxicité significativement supérieure aux autres conditions. De plus, nous savons que l'efficacité de transfection est généralement diminuée par la présence de SAB ou de sérum. Par conséquent, le protocole de transfection utilisant du milieu OPTIMEM seul, des tubes non traités et un changement de milieu après 4h d'incubation, a été conservé pour les expériences ultérieures.



**Figure 1: Evaluation de la toxicité des conditions de culture des hDCs.** (A) Schéma explicatif des conditions de culture. Les hDCs matures ont été mises en culture pendant 4h dans 1 ml d'OPTIMEM, OPTIMEM + 10% SVF ou OPTIMEM + 2% SAB, sur plaque de 24 puits traitées (rouge) ou non au méthacrylate, ou dans des tubes traités (vert) ou non (bleu) au polyméthacrylate. Après 4h, le milieu a été remplacé par du milieu hDCs complet. Selon les conditions, le support de culture a été également changé. (B) La toxicité a été analysée en cytométrie en flux en présence d'iodure de propidium. Les cellules marquées par l'iodure de propidium étant considérée comme mortes ou non viables.

## Transfection des hDCs avec l'ARNm complexé avec les vecteurs histidylés.

Nous avons transféré l'ARNm codant la protéine antigénique MelanA/MART1 humaine dans des hDCs, immatures ou matures, à l'aide des différents vecteurs. L'expression de l'antigène a été évaluée en cytométrie en flux 24h après transfection. Comme le montre la Figure 2A, aucune expression de l'antigène MART-1 n'est détectée dans les hDCs immatures transfectées avec les polyplexes ARNm-MART1/PEI-HIS. Au contraire, avec les DCs matures on observe une fluorescence nettement supérieure après transfection de l'ARNm MART1 qu'après transfection de l'ARNm Luc, témoignant de l'expression de MART1 dans ces cellules (Figure 2B). Le polymère PEI-HIS semble donc être efficace pour transfecter uniquement les hDCs à l'état mature.



**Figure 2:** Transfection des hDCs par l'ARNm MART-1 à l'aide du polymère PEI-HIS. Les ARNm ARCA-MART1-A100 (rouge) ou ARCA-Luc-A100 ont été complexés avec le polymère PEI-HIS (rapport ARNm/Polymère 1/ 3,  $\mu\text{g}:\mu\text{g}$ ). Les polyplexes obtenus ont été incubés 4h avec les hDCs immatures (A) ou matures (B). Le milieu de transfection a été éliminé et les cellules cultivées pendant 24h dans du milieu complet. La détection de la protéine MART1 a été effectuée par cytométrie en flux après marquage avec l'anticorps anti-MART1.

Nous nous sommes donc attachés au suivi de l'expression de la protéine antigénique MelanA/MART1 humaine dans les hDCs matures à différents temps après transfert de l'ARNm correspondant. La transfection a été effectuée à l'aide de la PEI histidylée ou la PEI, mais également avec les liposomes HDHE : Cho et le mélange des deux vecteurs. Afin de déterminer les conditions optimales d'efficacité de transfert, nous avons fait varier les rapports massiques des partenaires dans les polyplexes ARNm/polymère, les lipoplexes ARNm/liposomes et les lipopolyplexes ARNm/polymère/liposomes. Les DCs transfectées ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-MART1 couplé à la phycoérythrine, après 4h, 7h ou 24h de transfection. La détection de MART1 a été effectuée par cytométrie en flux.

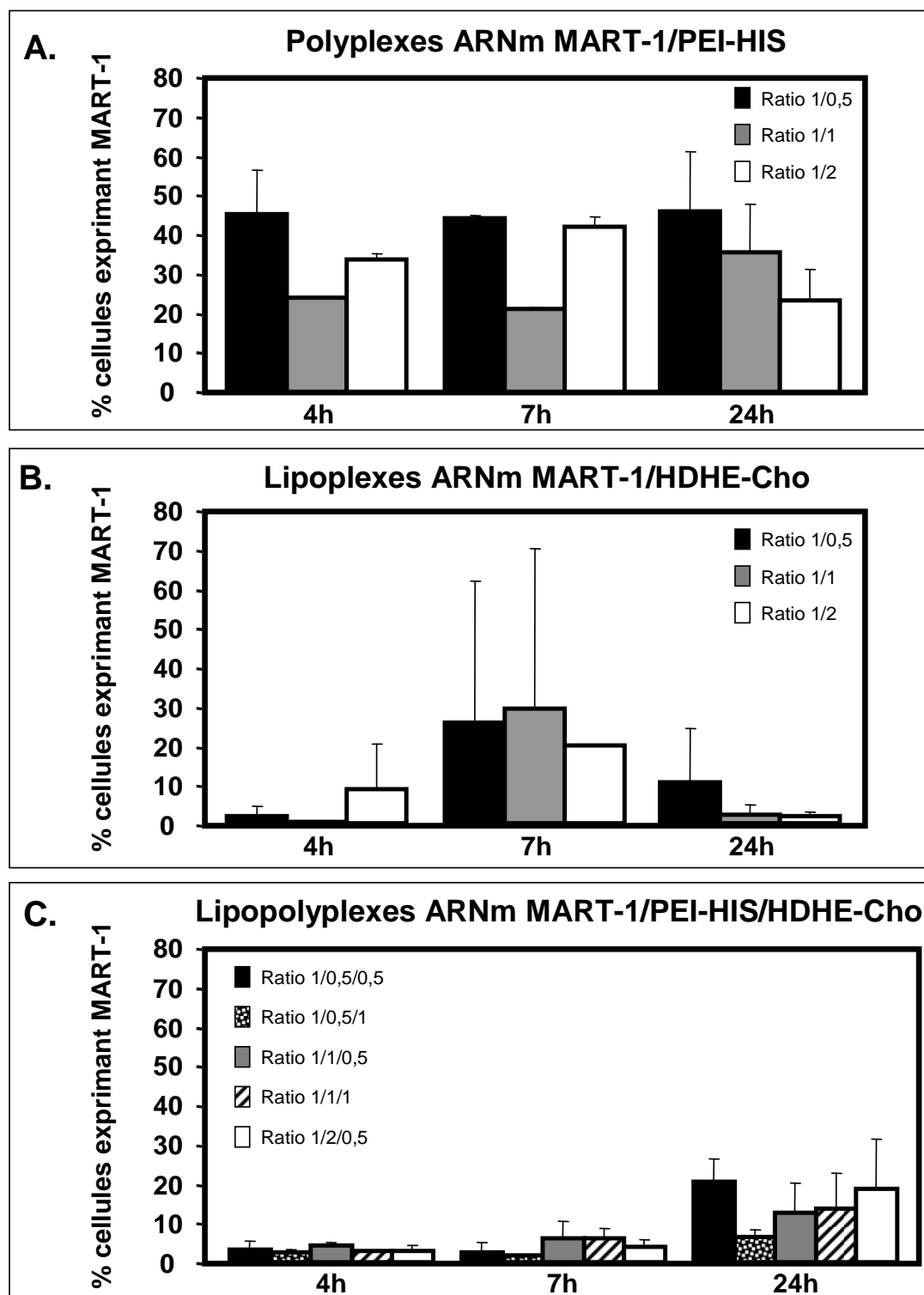
Comme le montre la Figure 3A, on peut observer une expression de la protéine MART-1 dès 4h dans environ 45% des cellules lorsque la transfection est réalisée avec le polymère PEI-HIS au rapport 1/0,5 (ARNm/PEI-HIS ;  $\mu\text{g} : \mu\text{g}$ ). Cette expression est la même après 7h et 24h. Un rapport 1/1 conduit à 20% de cellules exprimant MART1 entre 4h et 7h et passe à 35% à 24h. Avec un rapport 1/2, c'est à 7h que l'expression de MART1 est la plus forte (40%). La trop forte toxicité de la PEI non histidylée n'a pas permis de transfecter des hDCs matures (résultats non montrés).

Les transfections avec les liposomes seuls ne permettent pas de transfecter les hDCs matures de façon reproductible et ce quelque soit le rapport ARNm/HDHE : Cho testé (Figure 3B).

Lorsque les transfections sont effectuées avec les lipopolyplexes, un maximum de 20% de cellules exprimant la protéine MART1 est observable, mais seulement à 24h (Figure 3C). C'est le rapport 1/ 0,5/0,5 qui donne le meilleur résultat.

Ces résultats indiquent tout d'abord que parmi les formulations de vecteurs histidylés testées, seul le polymère PEI-HIS permet une transfection efficace des hDCs matures par l'ARNm MART1. Le rapport 1/0,5 (ARNm/Vecteur,  $\mu\text{g} : \mu\text{g}$ ) étant le plus approprié. Cependant, on ne constate pas de relation directe entre le rapport ARNm/vecteur ( $\mu\text{g} : \mu\text{g}$ ), qui peut être assimilé au degré de condensation de l'ARNm par le polymère cationique, et la durée d'expression de la protéine antigénique. Ce résultat diffère quelque peu de ce que nous avons pu observer lors de la transfection des cellules de la lignée de DCs murines JAWSII à l'aide des mêmes polyplexes. En effet, nous avons constaté que plus le rapport ARNm/vecteur était élevé, plus l'expression maximale de l'antigène MART1 dans les cellules JAWSII était précoce : 4h pour un rapport 1/1, 8h pour le rapport 1/2 et 24h pour le rapport 1/3. Les liposomes HDHE : Cho sont inefficaces pour la délivrance d'ARNm dans les hDCs matures et leur mélange avec le polyplexe ne permet pas d'augmenter l'efficacité de transfection par rapport au PEI-HIS. En effet, l'utilisation des lipopolyplexes conduit à une faible expression de la protéine, voire à une diminution par rapport à celle observée pour le

polymère seul à 24 h (20% au rapport 1/ 0,5/0,5 contre 45% au rapport 1/0,5 respectivement).

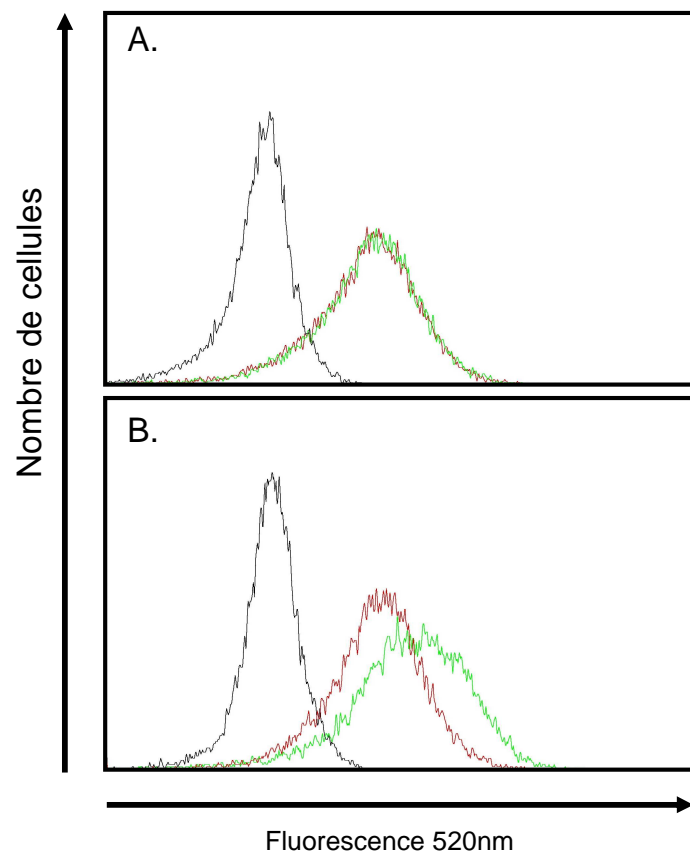


**Figure 3:** Transfection des hDCs matures par l'ARNm MART-1 à l'aide du polymère PEI-HIS et/ou des liposomes HDHE-Cho. L'ARNm ARCA-MART1-A100 a été complexé avec le polymère PEI-HIS (A), les liposomes HDHE-Cho (B) ou le mélange des deux vecteurs (C). L'ARNm ARCA-Luc-A100 est utilisé comme contrôle. Les polyplexes, lipoplexes et lipopolyplexes respectivement obtenus ont été incubés 4h avec les cellules avant un changement de milieu. La détection de la protéine MART1 a été effectuée à 4h, 7h ou 24h après marquage avec un anticorps anti-MART1 par cytométrie en flux.



## **Internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm dans les hDCs.**

Aucune expression de la protéine MART1 n'a été détectée dans les DCs immatures alors que le polymère PEI-HIS permet une transfection efficace des DCs matures. Nous avons essayé de comprendre les raisons de cette différence d'efficacité de transfection entre les deux stades de maturation des hDCs. Une des causes première pouvant se situer au niveau de l'internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm. Pour cela, les hDCs matures et immatures ont été incubées à 37°C en présence d'ARN m ARCA-LUC-A100 marqué ou non avec la fluorescéine et complexé avec le PEI-HIS. L'ARNm non marqué étant utilisé comme contrôle. Après 4h d'incubation, l'intensité de fluorescence des hDCs a été mesurée par cytométrie en flux après traitement ou non en présence de monensine. Cet ionophore carboxylique monovalent échange un sodium contre un proton et permet de neutraliser le pH des compartiments cellulaires acides tels que les endosomes et les lysosomes. Par rapport aux cellules incubées avec l'ARNm Luc non fluorescent, un marquage des deux types de hDCs est observable après 4h d'incubation en présence des polyplexes PEI-HIS/ARNm fluorescent (Figure 4). Après traitement à la monensine, on constate une augmentation de la fluorescence seulement pour les hDCs matures (Figure 4B). Au contraire, la monensine n'a pas d'effet sur l'intensité de fluorescence des hDCs immatures (Figure 4A). L'internalisation de l'ARNm a donc une composante pH-dépendante dans le cas des hDCs matures indiquant un transfert de l'ARNm dans les compartiments acides.



**Figure 4 : Internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm dans les hDCs.** Les hDCs immatures (A) ou matures (B) ont été transfectées, à l'aide du polymère PEI-HIS, par un ARNm marqué à la fluorescéine. L'ARNm non marqué a été utilisé comme contrôle (noir). La formation des polyplexes a été effectuée dans un rapport ARNm/polymère de 1:3 ( $\mu\text{g}:\mu\text{g}$ ). Les cellules ont été incubées 4h dans la solution de transfection puis 30min à 4°C en présence (vert) ou non (rouge) de monensine (50 $\mu\text{M}$ ). L'intensité de fluorescence des cellules a été analysée en cytométrie en flux.

## DISCUSSION

La transfection de DCs avec l'ARNm d'un antigène tumoral présente un intérêt certain dans le cadre de protocole de vaccination anticancéreuse impliquant la manipulation de ces cellules *ex vivo* et leur réinjection chez le patient.

Afin de générer une réponse immune correcte, et éviter la mise en place d'une tolérance vis à vis de l'antigène, il est recommandé d'injecter chez le patient des DCs matures plutôt que des DCs immatures [14]. Bien que les DCs immatures aient une plus grande capacité de phagocytose, les DCs matures acquièrent des propriétés de migration vers les ganglions lymphatiques, de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de présentation antigéniques leur permettant une meilleure stimulation des CTLs. Cependant, le stade de maturation auquel les DCs doivent être modifiées dans les protocoles d'immunothérapie reste un paramètre important, qui nécessite d'être déterminé en fonction du type de vectorisation utilisée. En effet, dans les approches virales, il a été rapporté que les AAV ont un tropisme particulier pour les DCs immatures qui expriment l'intégrine  $\alpha\beta 5$ . Dans ce cas la transduction des hDCs est suivie de leur mise en maturation [15]. Dans le cas de l'électroporation d'ARNm, il n'a pas été observé de différences au niveau de l'expression de la protéine antigénique en fonction de l'état de maturation des DCs [16].

Nous avons pu établir un protocole de transfection des hDCs matures par l'ARNm de l'antigène MART1 en utilisant le PEI-HIS. Ce protocole conduit à une bonne expression de la protéine antigénique. Une évaluation des conditions de culture des cellules pour cette dernière étape a montré une toxicité de 20 à 25%, ce qui est acceptable pour les utilisations ultérieures. A l'inverse de la PEI qui génère une toxicité élevée, le PEI-HIS apparaît peu toxique dans les hDCs matures. Il semblerait donc que la substitution de quelques fonctions amines primaires de la PEI par l'histidine réduise fortement la toxicité du polymère cationique. Il est également apparu que les polyplexes ARNm/PEI-HIS sont plus efficaces que les lipoplexes ou les lipopolyplexes correspondants. Dans les meilleures conditions, environ 50% des hDCs expriment la protéine MART1. Par contre, aucune expression de l'antigène n'a pu être détectée dans les DCs immatures avec l'utilisation de polyplexes ARNm/PEI-HIS. Les résultats que nous avons obtenus en utilisant la lipofectamine avaient déjà montré une plus faible expression de la luciférase dans les hDCs immatures que dans les hDCs matures [11]. Nous avons également constaté qu'en fonction des lots de cellules dendritiques utilisées, le nombre de cellules matures transfectées variait. Cette variation est à mettre en relation avec celle du rendement de maturation des hDCs. En effet, nos vecteurs se sont avérés moins efficaces pour la transfection des hDCs immatures et selon les lots cette catégorie représentait 20% à 50% des cellules totales. Ce taux de hDCs immatures n'étant pas négligeable, il serait donc intéressant de développer des vecteurs également

performants dans le transfert d'ARNm dans les DCs immatures afin de s'affranchir de ce paramètre. Ces vecteurs pourraient aussi favoriser leur maturation comme cela a été rapporté pour certains lipides cationiques [2, 6]. La conception de tels vecteurs pourra être entreprise avec une connaissance plus approfondie du mécanisme d'internalisation des polyplexes dans les DCs immatures. En effet, une étude préliminaire de ce processus indique que l'ARNm transite dans les hDCs matures au niveau de vésicules acides alors que ce n'est pas le cas pour les hDCs immatures. A l'état mature, le PEI-HIS peut donc induire une déstabilisation membranaire. Cette déstabilisation peut résulter d'une perméabilisation de la membrane des vésicules acides, après protonation du noyau imidazole des résidus histidyles et/ou d'un effet tampon d'« éponge à proton » comme pour les amines secondaires de la PEI, conduisant à un gonflement et une fragilisation des vésicules [17]. Ceci favorisant un passage de l'ARNm dans le cytosol où la traduction peut être effectuée. Au contraire, dans les hDCs immatures la délivrance de l'ARNm dans le cytosol est faible, voire inefficace. Ces résultats d'internalisation semblent donc en accord avec le niveau d'expression protéique obtenu après transfection.

L'efficacité de stimulation d'une réponse immune par des DCs matures transfectées avec des lipopolyplexes ARNm MART1/PEI-HIS sera évaluée *in vitro* par des expériences d'activation de CTLs.

## RÉFÉRENCES

1. Liao X, Li Y, Bonini C, Nair S, Gilboa E, Greenberg PD, Yee C: **Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes.** *Mol Ther* 2004, **9**(5):757-764.
2. Tan PH, Beutelspacher SC, Wang YH, McClure MO, Ritter MA, Lombardi G, George AJ: **Immunolipoplexes: an efficient, nonviral alternative for transfection of human dendritic cells with potential for clinical vaccination.** *Mol Ther* 2005, **11**(5):790-800.
3. Su Z, Vieweg J, Weizer AZ, Dahm P, Yancey D, Turaga V, Higgins J, Boczkowski D, Gilboa E, Dannull J: **Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product.** *Cancer Res* 2002, **62**(17):5041-5048.
4. Zeis M, Siegel S, Wagner A, Schmitz M, Marget M, Kuhl-Burmeister R, Adamzik I, Kabelitz D, Dreger P, Schmitz N *et al*: **Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells.** *J Immunol* 2003, **170**(11):5391-5397.
5. Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A: **Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes.** *Gene Ther* 2000, **7**(23):2028-2035.
6. Rughetti A, Biffoni M, Sabbatucci M, Rahimi H, Pellicciotta I, Fattorossi A, Pierelli L, Scambia G, Lavitrano M, Frati L *et al*: **Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity.** *Gene Ther* 2000, **7**(17):1458-1466.
7. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: **Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells.** *Blood* 2001, **98**(1):49-56.
8. Kalady MF, Onaitis MW, Padilla KM, Emani S, Tyler DS, Pruitt SK: **Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy.** *J Surg Res* 2002, **105**(1):17-24.
9. Kumar VV, Pichon C, Refregiers M, Guerin B, Midoux P, Chaudhuri A: **Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH.** *Gene Ther* 2003, **10**(15):1206-1215.
10. Pichon C, Goncalves C, Midoux P: **Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2001, **53**(1):75-94.
11. Mockey M, Goncalves C, Dupuy FP, Lemoine FM, Pichon C, Midoux P: **mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **340**(4):1062-1068.
12. Midoux P, Roche AC, Monsigny M: **Quantitation of the binding, uptake, and degradation of fluoresceinylated neoglycoproteins by flow cytometry.** *Cytometry* 1987, **8**(3):327-334.
13. Monsigny M, Roche AC, Midoux P: **Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L1210 cells evidenced by quantitative flow cytofluorometry and drug targeting.** *Biol Cell* 1984, **51**(2):187-196.
14. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N: **Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.** *J Exp Med* 2001, **193**(2):233-238.
15. Zhong L, Granelli-Piperno A, Choi Y, Steinman RM: **Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells.** *Eur J Immunol* 1999, **29**(3):964-972.
16. Schaft N, Dorrie J, Thumann P, Beck VE, Muller I, Schultz ES, Kampgen E, Dieckmann D, Schuler G: **Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation.** *J Immunol* 2005, **174**(5):3087-3097.
17. Kichler A, Leborgne C, Danos O: **Dilution of reporter gene with stuffer DNA does not alter the transfection efficiency of polyethylenimines.** *J Gene Med* 2005, **7**(11):1459-1467.

## 2<sup>ème</sup> PARTIE

### **Vaccination anti-cancéreuse par injection directe de l'ARNm d'un antigène tumoral.**

#### **RÉSUMÉ**

L'injection directe d'un antigène tumoral est la voie la plus simple pour susciter une réponse immune anticancéreuse. Dans ce contexte, l'utilisation d'un ARNm codant pour cet antigène apparaît comme une stratégie prometteuse pour obtenir une vaccination contre le cancer. Cependant, la délivrance de l'ARNm dans les cellules immunocompétentes nécessite le développement de vecteurs efficaces pour son transfert et sa traduction en protéine. Le caractère pH-sensible des vecteurs histidylés les rend parfaitement adaptés pour accomplir cette fonction. En effet, ils acquièrent des propriétés fusiogènes vis-à-vis des membranes cellulaires en milieu acide tel que celui de la lumière des endosomes. Ils favorisent ainsi un transfert efficace de l'ARNm dans le cytosol. Cependant, le caractère cationique des polymères en général (polylysine, PEI, etc) conduit à la formation d'agrégats de polyplexes dans les conditions physiologiques en sels. De plus, ils se concentrent essentiellement au niveau des poumons lors d'une administration par voie systémique. Il a précédemment été montré au laboratoire que la fixation d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) de masse molaire de 5 kDa par molécule de HpK empêche cette agrégation (Pichon, Goncalves et coll. 2001). Des résultats obtenus par scintigraphie avec de l'ADN plasmidique ont montré que cette PEGylation évite également une accumulation au niveau pulmonaire et permet une distribution hépato-splénique des polyplexes injectés en i.v. (résultats non publiés du laboratoire). Pour ces raisons, nous avons donc utilisé la polylysine histidylée et PEGylée, au lieu de la HpK ou de la PEI-HIS, pour le transfert d'un ARNm d'antigène tumoral *in vivo*.

Dans le premier manuscrit présenté que nous avons soumis à « *Journal of the American Chemical Society* » pour publication, nous décrivons les synthèses d'un dérivé PEGylé de polylysine histidylée (HpK-PEG) et du lipide histidylé [HDHE (L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)éthylamide)] ainsi que la caractérisation physicochimique des complexes obtenus avec un ARNm synthétisé par transcription *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que les complexes ternaires polymère/ARNm/liposomes correspondent à des polyplexes ARNm/HpK-PEG encapsulés dans les liposomes HDHE :Cho. Dans une approche vaccinale par injection systémique de l'ARNm MART1 (ARCA-MART1-A100) dans des souris C57BL/6, nous montrons que seule sa vectorisation sous forme de lipopolyplexes induit un

effet protecteur, spécifique et significatif ( $p < 0,01$ ), de la progression tumorale cutanée du mélanome d'origine B16F10. L'injection de l'ARNm seul ou complexé sous forme de polyplexes ou de lipoplexes n'induit aucun effet protecteur.

Dans le second manuscrit, que nous avons soumis à « *Cancer Immunology, Immunotherapy* » pour publication, nous rapportons que cette vaccination est également efficace contre le développement de métastases pulmonaires B16F10. Dans le modèle cutané du mélanome, nous montrons que seule l'administration de lipopolyplexes contenant un ARNm MART-1 munis d'une queue poly(A) de 100 résidus adénosine permet d'observer cet effet protecteur. Nous montrons également qu'aucune inhibition de la croissance tumorale n'est observée après injection de l'ADN plasmidique codant l'antigène MART1. La dose optimale en ARNm ARCA-MART1-A100 a été déterminée à 12,5 µg. Nous décrivons aussi les mécanismes immunitaires induits par l'injection systémique de l'ARNm MART-1. La mise en place d'une réponse humorale avec la sécrétion d'anticorps anti-B16F10 n'a pu être détectée. Au contraire, la production de cytokine de type IFN- $\gamma$  ainsi qu'une activité T cytotoxique, toutes deux caractéristiques d'une réponse immune de type Th1, sont mises en évidence dans les splénocytes et les ganglions lymphatiques des souris immunisées. Enfin, l'injection conjointe de l'ARNm MART1 avec une version sig-MART1-LAMP1 permettant un adressage aux vésicules de classe II des présentatrices d'antigènes, permet d'augmenter la réponse anti-mélanome.

L'ensemble des résultats obtenus avec le mélanome murin B16 montrent l'efficacité des lipopolyplexes histidylés pour délivrer *in vivo* l'ARNm d'un antigène tumoral aux cellules immunocompétentes et induire une réponse antitumorale spécifique.

**Les lipopolyplexes de polylysine PEGylée riche en histidine/ L-histidine-(N,N-di-n-hexadécylamine)éthylamide/ ARNm comme vecteur efficace pour une délivrance in vivo d'un antigène tumoral.**



# **PEGylated histidine-rich polylysine / L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide / mRNA Lipopolyplexes as efficient vectors for in vivo delivery of tumour antigen.**

**Michael Mockey,<sup>1</sup> Cristine Gonçalves,<sup>1</sup> Valérie F.J. Quesniaux,<sup>2</sup> Sophie Lafosse,<sup>3</sup> Eric Le Cam,<sup>3</sup> Voshavar Chandrashekhar,<sup>4</sup> Arabinda Chaudhuri,<sup>4</sup> Chantal Pichon,<sup>1</sup> Patrick Midoux,<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301CNRS affiliated to the University of Orléans and Inserm, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France

<sup>2</sup> Institut de Transgénose, Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire, CNRS UMR 6218, 3B rue de la Ferrollerie 45071 Orléans cedex 2, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR 8126, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

<sup>4</sup>Division of Lipid Science and Technology Indian Institute of Chemical Technology Hyderabad- 500 007, India

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [midoux@cnrs-orleans.fr](mailto:midoux@cnrs-orleans.fr)

**Running title :**

**Key words :** RNA ; polylysine ; cationic lipid ; liposomes; histidine ; melanoma ; MelanA ; MART1 ; vaccine

*Submitted to "Journal of the American Chemical Society"*

## ABSTRACT

The injection of genetic material encoding tumour antigen appears to be a promising vaccine strategy for cancer. For this purpose, the occurrence of translation mechanism in the cytosol offers advantages to mRNA transfer over DNA-based transfection in non-dividing cells. We synthesized a PEGylated derivative of histidylated polylysine and L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide in order to vectorize mRNA. The originality of these pH-sensitive histidylated molecules concerns their fusogenic property in an acidic medium such as the lumen of endosomes favouring the cytosolic delivery of nucleic acids and their low toxicity. We characterized the size, charge and shape of their complexes with an in vitro transcribed tumor antigen mRNA. We showed that the ternary polymer / lipids / nucleic acid complexes termed lipopolyplexes exhibited a size of 125 nm and 325 nm in size and a  $\zeta$  potential of 17 mV. The mRNA/polymer complexes were encapsulated by the liposomes. We found that systemic injections of the melanoma-associated antigen MART1 mRNA formulated as lipopolyplexes protected specifically and significantly ( $p < 0.01$ ) mice against B16F10 melanoma tumour progression. Comparatively, no significant protection was obtained with a plasmid DNA encoding MART1. The distinguished features of the mRNA-lipopolyplex formulation described herein and most importantly the findings that successful anti-B16 immunization was realized only with mRNA lipopolyplexes make these novel class of lipopolyplexes important next generation non-viral vectors for future use in mRNA-based tumor vaccination.

## INTRODUCTION

Patient injection with genetic material encoding tumour as well as viral antigen or genetically modified antigen presenting cells (APC) expressing tumour or viral antigen appear to be promising vaccine strategies for cancer and infectious diseases.<sup>1-6</sup> The introduction of genetic material encoding an antigenic protein into APC will allow antigen expression in its native state, its processing and will direct the presentation of all the epitopes. Although injecting patients with dendritic cells (DCs) transfected ex vivo with DNA encoding antigen appears to be a promising approach, this form of cellular immunotherapy still requires improvements and will remain expensive and patient dependent. Direct immunization with genetic material encoding antigen will be more comfortable but the efficiency of DNA-based transfection of APC is still limited except when lentivirus-derived vectors are used.<sup>7</sup> Therefore, it is desirable to improve vaccine safety potential by using non viral vectors and by limiting a DNA integration in the host genome which could induce deregulation in gene expression, eventually leading to tumours. For vaccine applications, the immediate expression of a selected protein over a limited time (e.g. a few hours) is needed. For these reasons, mRNA instead of DNA as a nucleic acid-based strategy offers several advantages. mRNA are quickly translated in all cell types and allow a transient expression of the antigenic protein. Furthermore, there is no uncontrolled long-term expression of the antigen as might occur with the integration of DNA-vaccine in the cell genome. Moreover, mRNA do not bear any regulatory DNA sequences (promoters, terminators, enhancer, etc) and no antibiotic-resistance genes are injected in the vaccinated population. Finally, the occurrence of translation mechanism in the cytosol offers advantages to mRNA transfer over DNA-based transfection in non-dividing cells. It has been clearly demonstrated over recent years that a CTL-mediated anti-tumour and anti-viral response can be induced by dendritic cells transfected ex vivo with either mRNA from tumour cells or in vitro transcribed (IVT) mRNA of tumour-activated antigen and viral antigen.<sup>8-10</sup> Currently, direct immunization with IVT mRNA concerns few reports. Cationic liposomes and cationic peptide have been used to condense mRNA allowing protection against nucleases. The injection of liposomes/influenza virus nucleoprotein mRNA,<sup>11</sup> liposomes/human melanoma-associated antigen gp100 mRNA,<sup>12</sup> liposome/ovalbumin mRNA<sup>13</sup> and protamine/ $\beta$ -galactosidase mRNA<sup>14</sup> complexes were found to prime CTL responses in mice. We have designed Histidine-rich cationic polymers and histidylated cationic lipids which are efficient for the transfection of various cell types.<sup>15-17</sup> Their originality concerns the fusogenic properties that they exhibit in an acidic medium such as in endosomes favouring the cytosolic delivery of nucleic acids. Recently, we have optimised an mRNA construct (termed ARCA-mRNA-A100) allowing a high level of protein upon lipofection of dendritic cells.<sup>18</sup> This mRNA was capped with 3'-O-methyl-

m7<sup>5'</sup>Gppp<sup>5'</sup>G (Anti-Reverse Cap Analogue; ARCA) and bore a Poly(A) tail of at least 100 adenosines *in cis*. It increased by 700-fold the protein level into DCs compared to a mRNA classically capped with m7<sup>5'</sup>Gppp<sup>5'</sup>G and bearing a Poly(A) tail of 64 adenosines.

Here, we report on the use of the above-mentioned mRNA construct and the lipopolyplex vectors in immunizing mice against B16F10 melanoma directly with the IVT mRNA of the human melanoma MART1 (MelanA) antigen. We described the synthesis of a PEGylated derivative of histidylated polylysine, L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide and the characterization of MART1 mRNA complexes with either the cationic polymer (polyplexes), the histidylated liposomes (lipoplexes) or the mixture of both (lipopolyplexes). We showed that lipopolyplexes comprised mRNA polyplex encapsulated by the liposomes. Finally, we found that only IVT MART1 mRNA formulated as lipopolyplexes exhibited a significant delayed B16 melanoma growth.

## EXPERIMENTAL SECTION

All reagents were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise.

### PEG-HpK synthesis

Histidylated polylysine (HpK) was prepared as previously described.<sup>19</sup> Poly-L-lysine of 190 lysyl residues (pK; Bachem feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland) (1g in 200 ml H<sub>2</sub>O) was passed through an anion-exchange column (Dowex 2x8, <sup>-</sup>OH form, 20-50 mesh) to remove bromide ions. The eluate was neutralized with a 10% *p*-toluenesulfonic acid solution in water and freeze-dried. pK, *p*-toluenesulfonate salt (400 mg) in 30 ml DMSO in the presence of diisopropylethylamine (190  $\mu$ l) was reacted overnight at 20°C with (Boc)His(Boc)-Osu (345 mg in 2 ml DMSO). The N-protecting Boc groups were removed by acidic treatment in H<sub>2</sub>O/TFA mixture (1:1; v/v) for 24h at 20°C. Water and TFA were removed under reduced pressure. The polymer was precipitated by adding 10 volume of an isopropanol/ethyl acetate mixture (1:1; v/v), spun down by centrifugation (1800 g for 15 min), solubilized in distilled water and freeze-dried. HpK (250 mg; 3.5  $\mu$ mol in 3 ml DMSO) was coupled with one mPEG molecule of 5 KDa upon reaction for 4h at 20°C with the N-hydroxysuccinimide derivative of the mPEG-propionic acid (29 mg; 5  $\mu$ mol) (mPEG-SPA, Shearwater, Huntsville, AL, USA) in the presence of DIEA (116  $\mu$ l; 850  $\mu$ mol). The polymer was precipitated in ethyl acetate, spun down by centrifugation (1800 g for 15 min), solubilized in distilled water and freeze-dried. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (500 MHz in D<sub>2</sub>O at acidic pH) :  $\delta$ /ppm = 1.3-1.9 [m, 6H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>]; 2.4 [s, methyl of tosyl]; 2.75 [s, trace of DMSO]; 2.94 [s, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>]; 3.1 [s, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-]; 3.3 [d, 2H, CH(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)-CH<sub>2</sub>-C=CH-]; 3.65 [s, 4H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]; 4.15-4.25 [m, 3H, -NH-CH-CO- + -CO-CH(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)-CH<sub>2</sub>- + -CH<sub>2</sub>-CH-CO-]; 7.25 [s, 1H, -N=CH-NH-]; 7.3 [d, 2H of tosyl ring]; 7.37 [s, 1H, -N=CH-NH-]; 7.65 [d, 2H of tosyl ring]; 8.6 [s, 1H, -NH-CH=C-]; 8.7 [s, 1H, -NH-CH=C-].

### HDHE synthesis

L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide was prepared as previously described.<sup>16</sup> Briefly, a mixture of (Boc)His(Boc)-OH (0.68 g; 1.9 mmol), dichlorohexylcarbodiimide (0.41 g; 2 mmol) and N-hydroxysuccinimide (0.27 g; 2.3 mmol) was dissolved in 8 ml of dry N,N-dimethyl-formamide and stirred for 1h at 20°C. N-2-aminoethyl-N,N-di-n-hexadecylamine (1 g; 2 mmol) in 2 ml of dry dichloromethane was added slowly to the mixture at 0°C and stirred for 24h. Then, 50 ml of dichloromethane was added to the reaction mixture, and the mixture was washed with water (3x100 ml) and dried with anhydrous sodium sulfate. Silica gel column chromatography (using 60-120 mesh size silica and 0.5-1% methanol in chloroform, v/v, as the eluent) of the residue afforded 1.1 g of

pure coupled product ( $R_f = 0.6$ , 5 : 95 MeOH :  $\text{CHCl}_3$ , v/v)). The N-protecting Boc groups were removed by acidic treatment with 2N HCl in dioxane at 20°C. The product was purified by silica gel column chromatography (using 60-120 mesh size silica and 10-15% methanol in chloroform, v/v, as the eluent).  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta/\text{ppm} = 0.9$  [t, 6H,  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-$ ]; 1.2-1.3 [m, 52H,  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-$ ]; 1.6-1.7 [m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-$ ]; 3.0 [m, 5H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}$ ]; 3.3 [m, 4H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$ ]; 3.5 [m, 2H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$ ]; 3.7 [m, 2H,  $-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$ ]; 4.3 [m, 1H,  $-\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}-$ ]; 7.2 [s, 1H,  $-\text{NH}-\text{CH}=\text{C}-$ ]; 8.3 [s, 1H,  $-\text{N}-\text{CH}=\text{N}-$ ]; 9.3 [s, 1H,  $-\text{NH}-\text{CO}-$ ]. FAB Mass Spectrum : m/z: 647 (40%).

### Liposomes

A lipid film was prepared under  $\text{N}_2$  by drying an ethanol solution of 5.4 mM of L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide and cholesterol (molar ratio of 1 : 2). The film was hydrated with 1 ml sterile 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, vortexed for 3 min and allowed to stand for 2 h at 4°C. The mixture was then vortexed and subjected to sonication for 15 min at 37 kHz using a Bioblock ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France).

### Plasmid DNA

The pGEM4Z-[MART1]-A64 plasmid encoding the MelanA/MART1 antigen under the T7 RNA polymerase promoter of  $\lambda$ -bacteriophage was kindly given by Dr A Bonehill and Dr K. Thielemans (Laboratory of Molecular and Cellular Therapy, Medical School of the Vrije University of Brussel, Belgium).<sup>20</sup> The pGEM4Z-[LUC]-A64 plasmid encoding the firefly luciferase gene (LUC) under the T7 RNA polymerase promoter of  $\lambda$ -bacteriophage was constructed as described.<sup>18</sup> pCMV-MART1 plasmid encoding the MelanA/MART1 antigen gene under control of the promoter of the human cytomegalovirus was kindly given by Dr Van den Eynde (Ludwig Institute for cancer research, Brussels, Belgium).

### In vitro transcribed mRNA

pGEM4Z-[MART1]-A64 and pGEM4Z-[LUC]-A64 were linearized with *SpeI*, purified using PCR purification kit (Qiagen) and used as templates for in vitro transcription. IVT mRNA were prepared with a 3' ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) cap and a 5' Poly(A) tail of 100 adenosines. We found that such IVT mRNA preparation allowed very efficient transfection into dendritic cells.<sup>18</sup> IVT mRNA was capped by using the mMessage mMachine® T7 Ultra kit (Ambion, Oxfordshire, UK) which allows a capping with 3'-O-methyl m<sup>7</sup>G<sup>5'</sup>Gppp<sup>5'</sup>G (Anti-Reverse Cap Analog).<sup>21</sup> Then, polyadenylation of IVT mRNA was performed with the Poly(A) tailing kit (Ambion). The length of the Poly(A) tail of IVT mRNA was determined as described by the manufacturer (Ambion). Briefly, Poly(A) tailing reaction was traced by using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP and after the reaction was complete, an aliquot of the transcription reaction was precipitated with TCA. The percentage of adenosine incorporated into the transcript mRNA was calculated by using [TCA precipitate (cpm)/ Total cpm] x 100. The total length of Poly(A) in IVT mRNA preparation was found to be 100A. Purification of

mRNA was performed by DNase I digestion, followed by a phenol/chloroform/isoamyl alcohol and a chloroform extraction, a precipitation in isopropanol and a washing in 70% ethanol. mRNA was solubilized in RNase free water and the quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis upon IVT mRNA denaturation at 65°C for 10 min. The IVT mRNA concentration was determined by absorbance at 260 nm using 1UA = 40 µg/ml. IVT mRNA was stored at –80°C in small aliquots in polypropylene cryotubes.

### **Endotoxin**

The presence of endotoxin in polymer, lipids and mRNA was less than 0.1 EU/ml as evaluated by *Limulus Amebocyte* lysate test method using QCL-1000 kit (Cambrex, Walkersville, USA).

### **Polyplexes**

PEG-HpK (75 µg in 50 µl water) was added to mRNA or pDNA (25 µg in 125 µl water), vortexed for 4 sec and stood for 30 min at 20°C. For injection in mice, the solution was diluted to 300 µl with water and adjusted to 0.15 M NaCl with a 3 M NaCl solution.

### **Lipoplexes**

mRNA (25 µg in 125 µl water) was added to 25 µl liposomes (50 µg in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4) and the solution was stood for 15 min at 20°C. For injection in mice, the solution was diluted to 300 µl with water and adjusted to 0.15 M NaCl with a 3 M NaCl solution.

### **Lipopolyplexes**

Liposomes (25 µl; 50 µg) was added to the polyplexes preparation, mixed gently and kept for 15 min at 20°C. For injection in mice, the solution was diluted to 300 µl with water and adjusted to 0.15 M NaCl with a 3 M NaCl solution.

### **ζ potential measurement**

The global surface charge of liposomes, polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes was measured by electrophoretic mobility using a ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France) with the following parameters: viscosity, 0.89 cP; dielectric constant, 79; temperature, 25 °C; Smoluchowsky constant F(ka), 1.50; maximum voltage of the current, 15 V. The system was calibrated using DTS5050 Electrophoresis Standard beads (Malvern). The measurement was performed ten times in aqueous deep cell on 0.6 ml samples containing a final mRNA concentration of 10 µg/ml.

### **Size measurement**

The size of liposomes, polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes was determined by quasi-elastic laser light scattering (QELS) using a ZetaSizer 3000 with a sample refractive index of 1.59; viscosity, 0.89 cP. The system was calibrated using 204 nm Nanosphere™

Size Standards beads (Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA). Measurements were performed 10 times on 1.4 ml of sample at 10 µg/ml mRNA. The size corresponds to an average size calculated by using the automatic analysis mode.

### **Transmission electron microscopy (TEM)**

TEM measurements were carried out by means of a LEO-Zeiss 902 electron microscope operating at 80kV, equipped with an electron spectrometer filtering out inelastic electrons for better imaging. Five µl of mRNA or polyplexes were deposited on carbon-coated grid activated by a glow-discharge in the presence of pentylamine, washed with 2% uranyl acetate, blotted and dried. For liposomes and lipopolyplexes, a negative contrast staining was used. In this case, 5 µl of samples were deposited on carbon-coated grid activated by a glow-discharge and 10 µl of 2% aqueous phosphotungstic acid solution (pH adjusted to 7.3 using 1N NaOH) was employed as staining solution. Observation was done in the dark-field mode.

### **Mice immunization**

All experiments were conducted according to French regulations on animal experimentation. IVT mRNA and pDNA formulations (300 µl, 25 µg) were injected at day 0 and day 7 intravenously in the tail vein of 9 weeks old C57BL/6 mice. Then, B16F10 cells ( $5 \times 10^5$  cells in 100 µl) were grafted subcutaneously on the back of mice at day 14. The volume of the tumour ( $V = L \times l^2/2$ ) was measured every 2 days by measurement of the short axis (l) and the long axis (L). Experiments were stopped at Day 26 when the tumor size of control mice reached 200 mm<sup>3</sup>.

### **Statistical analysis.**

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by Mann-Witney “U” test using Prism software. *p* values of < 0.05 were statistically significant.



## RESULTS

### PEGylated Histidine-rich polylysine (PEG-HpK).

The  $\epsilon$ -amino group of lysine residues of polylysine were reacted with the activated ester of (Boc)His(Boc)-OH, resulting in the introduction of histidine residues *via* an amide linkage into the side chain of polylysine. Fifty percent of the lysyl residues (90 residues) of the polymer were coupled to an histidine residue as estimated from the  $^1\text{H}$  NMR peak intensity ratio of the methylene proton at 2.94 ppm (b) of the free  $\epsilon$ -amino group of lysine residues to the one at 3.1 ppm (b') of the histidine-substituted lysine side chains (Figure 1). HpK was then reacted with 1.4 moles of the active ester of the mPEG-propionic acid. About 0.8 PEG molecule was bound per polymer molecule as calculated from the  $^1\text{H}$  NMR peak intensity ratio of the methylene protons (h) at  $\approx 3.5$  ppm of PEG to the methylene protons (a) of the lysyl side chain at 1.2-1.3 ppm. The presence of small peaks at 7.25 and 8.6 ppm corresponding to the imidazole protons of the unPEGylated polymer provided further evidence that there was only 0.8 PEG molecule per polymer.

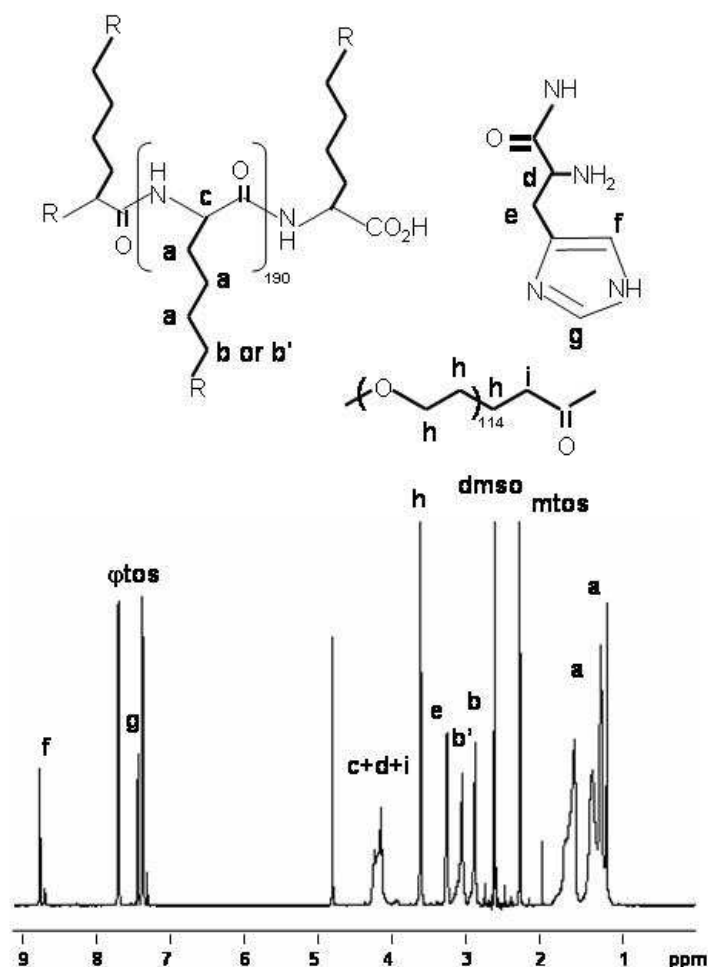


Figure 1.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PEG-HpK (solvent  $\text{D}_2\text{O}$ )

### Synthesis of L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide (HDHE).

N-2-aminoethyl-N,N-di-n-hexadecylamine was reacted with the activated ester of (Boc)His(Boc)-OH to introduce one histidine residue via an amide linkage into the amino group of cationic amphiphile (Figure 2).

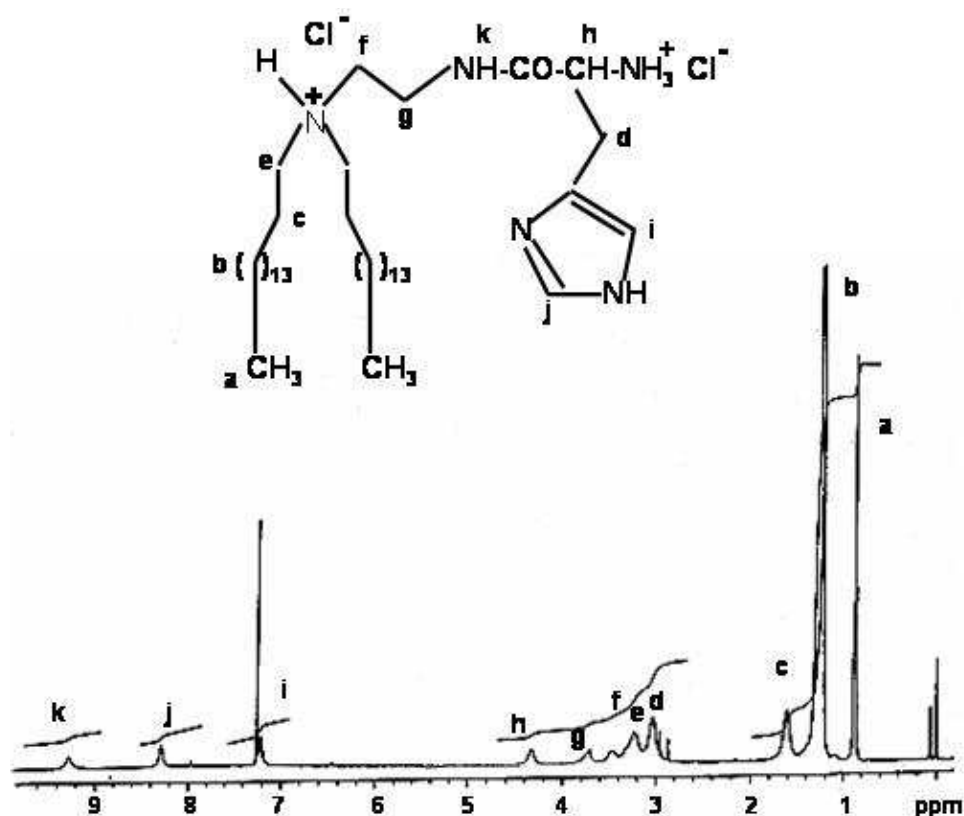
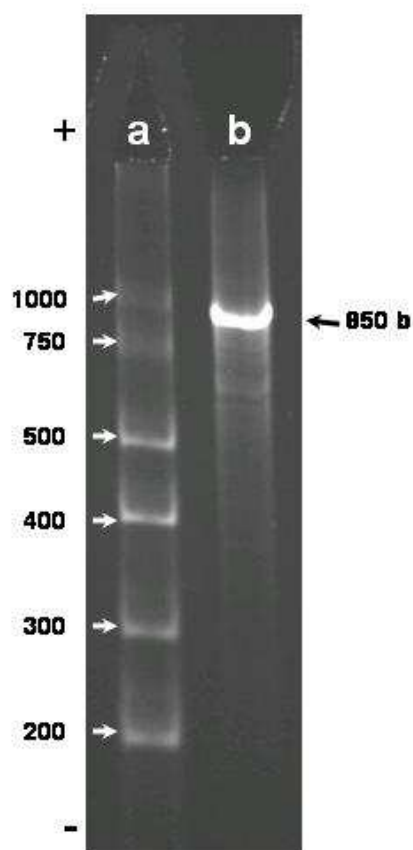


Figure 2. <sup>1</sup>H NMR spectrum of HDHE (solvent CDCl<sub>3</sub>)

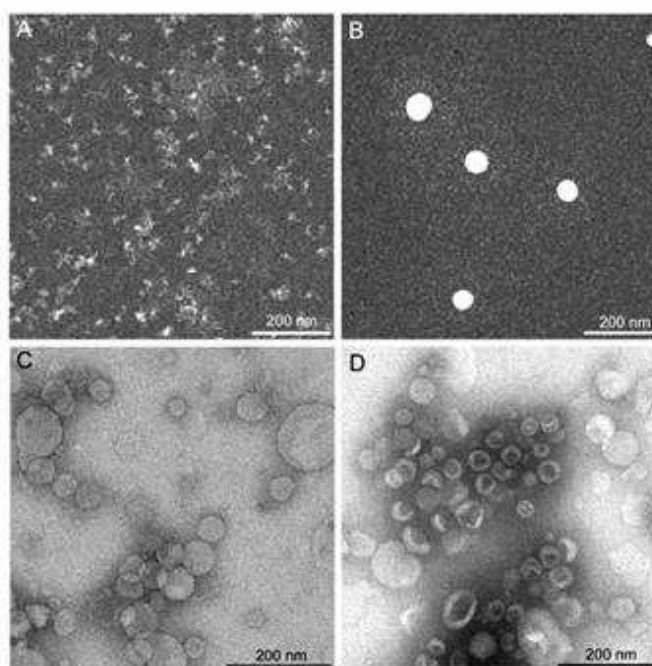
### Characterization of MART1 mRNA complexes.

The *in vitro* transcribed mRNA of MART1 exhibited a size of 850 bases corresponding to the T7 transcription initiation and the multiple cloning sites of the 5' untranslated region (60 nucleotides) followed by the coding region for hMART1 (690 nucleotides) and the 100 Adenosines representing the polyA stretch nucleotides at its 3' untranslated end (Figure 3).



**Figure 3.** RNA electrophoresis: (a) 2 $\mu$ g of RNA Century Size Markers-plus and (b) 2  $\mu$ g of MART1-mRNA transcript were electrophoresed on a 6M urea, 8% PAGE gel in TBE and stained with ethidium bromide.

A TEM analysis indicated that mRNA molecules exhibited a faint contrast and appeared as small fragments with sometimes small microaggregates (Figure 3a). This mRNA shape is a typical feature of a single stranded nucleic acid molecule.<sup>22</sup> mRNA polyplexes were formed with PEG-HpK at a mRNA / polymer weight ratio of 1 / 3 ( $\mu$ g :  $\mu$ g). This ratio corresponded to a N:P (ratio of the amino groups of PEG-HpK to mRNA phosphates) of 3 and allowed the absence of mRNA migration in an agarose gel electrophoresis (data not shown). As shown in Figure 3b, small aggregates were observed due to interaction between mRNA and PEG-HpK. The aggregates were dense and spherical as comparable to those observed for polyA and NCp7.<sup>22</sup> The size, the charge ( $\zeta$  potential) and the shape of polyplexes were evaluated by DLS, electrophoretic migration measurements and TEM, respectively. Table I summarizes the mean diameters and the charge of the particles.



**Figure 4.** Transmission Electron Microscopy observations of (A) MART1-mRNA, (B) MART1-mRNA/PEG-HpK complexes, (C) HDHE:chol liposomes and (D) MART1-mRNA/PEG-HpK/HDHE: chol complexes. TEM images were recorded after adsorption of molecules on activated carbon films and (A and B) uranyl acetate or (C and D) phosphotungstic acid staining, as described under “Material and Methods”. Bars represent 200 nm.

**Table I:** Size and charge measurements of liposomes and mRNA complexes

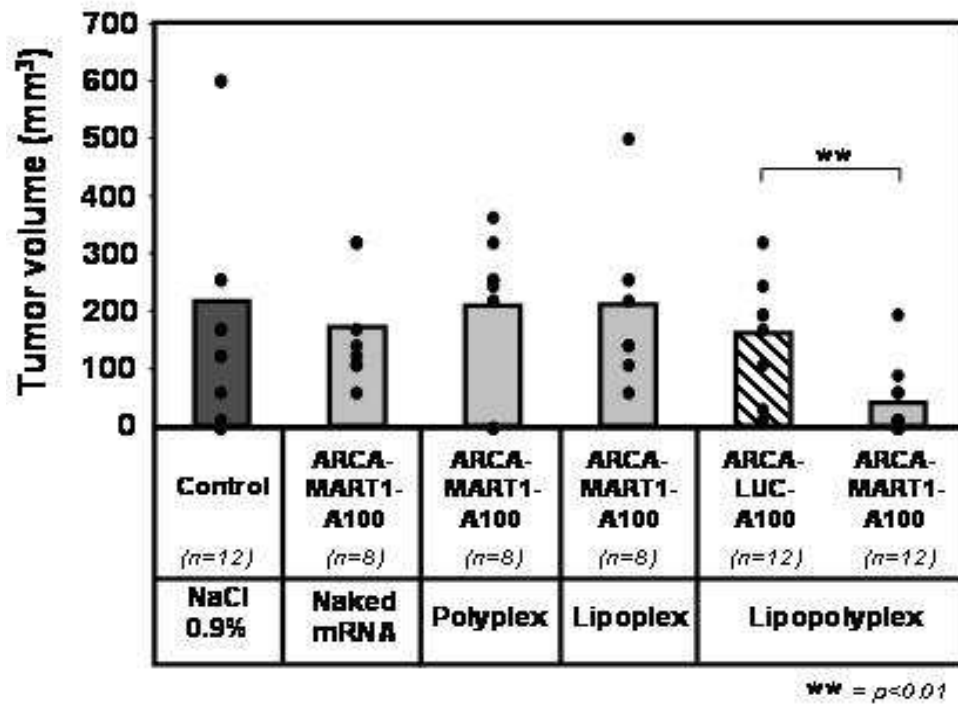
	DLS Size (nm)	TEM size (nm)	$\zeta$ potential (mV)
Polyplexes	$145 \pm 5$	$52 \pm 10$	$7 \pm 1$
Liposomes	$85 \pm 5$ (31 %)	$61 \pm 11$	$31 \pm 2$
	$268 \pm 4$ (69 %)	$109 \pm 25$	
Lipoplexes	$348 \pm 61$ (43 %)	ND	$-37 \pm 1$
	$1690 \pm 210$ (57 %)		
Lipopolyplexes	$125 \pm 15$ (48 %)	$57 \pm 12$	$17 \pm 1$
	$325 \pm 20$ (52 %)	$100 \pm 10$	

DLS measurements indicated that polyplexes in solution exhibited a spherical shape of ~145 nm in diameter. Polyplexes were weakly positively charged due to the linkage of PEG to the cationic polymer reducing the apparent complex charge. Moreover, PEGylation prevents the aggregation of particle in the presence of physiological salt concentration and diminishes the interactions with serum proteins.<sup>23</sup> Liposomes formed with HDHE and

cholesterol (molar ratio of 1 : 2) appeared as two populations of 85 nm and 270 nm in solution which were highly positively charged. As shown by TEM, liposomes appeared as unilamellar vesicles (Figure 3c). When mixed with mRNA, the size of vesicles increased and large aggregates appeared. Surprisingly, the  $\zeta$  potential was negative (-37 mV). This might indicate that the interaction of mRNA with liposomes was weak or a part of the nucleic acid charges was exposed at the vesicle surface. Ternary complexes between mRNA, PEG-HpK and liposomes (termed lipopolyplexes) were prepared by mixing liposomes with pre-formed mRNA/PEG-HpK polyplexes at a mRNA / polymer / lipids weight ratio of 1 / 3 / 2 ( $\mu\text{g} : \mu\text{g} : \mu\text{g}$ ). DLS measurements of the lipopolyplex solution indicated that there was also two vesicle populations of 125 nm and 325 nm. The observed size enhancement was probably due to the entrapment of polyplexes by liposomes. Indeed, TEM showed that the mixture of polyplexes with liposomes lead to vesicles with a dense core in their middle. Empty vesicles corresponding to the excess of liposomes were also present in the mixture but empty polyplex particles were not observed. The global charge of the lipopolyplexes was less (17 mV) positive than that of free liposomes. It is noticeable that the diameter of particles determined by DLS was lower than that found by TEM (Table I).

### **Immunization with MART1 mRNA lipopolyplexes prevents tumour growth.**

Mice were immunized with two i.v. injections of 25  $\mu\text{g}$  mRNA at day 0 and day 7. Seven days later, mice were challenged with a s.c. injection of a tumorigenic dose of B16F10 cells. Appearance and size of the tumour were determined and experiments were stopped at day 26 for ethical reason. Figure 4 summarizes the volume of the tumour at day 26 as a function of treatment. There was a significant and specific ( $p < 0.01$ ) protection against the tumour growth only in mice immunized with MART1 mRNA lipopolyplexes. The average tumour volume in these mice was only 39  $\text{mm}^3$  whilst it was 158  $\text{mm}^3$  when mice were immunized with LUC-mRNA lipopolyplexes and that of non-immunized mice 217  $\text{mm}^3$ . No protection ( $p > 0.5$ ) was obtained upon injection of free MART1 mRNA (170  $\text{mm}^3$ ). Moreover, the vaccination efficiency was vector dependent. Indeed, no protection was observed when MART1 mRNA was complexed either with the polymer (211  $\text{mm}^3$ ) or the liposomes (208  $\text{mm}^3$ ). The immunization effect of MART1 mRNA was compared to that of a plasmid DNA encoding MART1 antigen (pCMV-MART1). The average tumour volume was only reduced by 29 % ( $p > 0.1$ ) in mice immunized with pCMV-MART1 lipopolyplexes whereas it was reduced by 87% ( $p < 0.05$ ) in mice immunized with MART1 mRNA lipopolyplexes as compared to non vaccinated control mice. Thus, the significant inhibition of the tumour growth obtained with lipopolyplexes containing MART1 mRNA was not seen with those containing pCMV-MART1 plasmid.



**Figure 5.** Induction of anti-tumour immunity. Mice received on day 0 and day 7 an i.v. injection of 25 µg MART1-mRNA or MART1-mRNA complexed with either PEG-HpK (polyplex), HDHE:chol liposomes (lipoplex) or PEG-HpK and HDHE:chol (lipopolyplex). Control mice received sodium chloride. On day 14, mice were subcutaneously challenged with B16F10 cells. Tumour volumes were measured and compared on day 26. Data represent individual mice and mean of tumour volume (n = 8 – 12 mice per group from 2 – 3 independent experiments). \*\*  $p < 0.01$ .

## DISCUSSION

We demonstrate here that IVT MART1 mRNA complexed with a PEGylated histidine-rich polylysine and encapsulated in histidylated liposomes (termed lipopolyplexes) was capable of inducing immunization and reduced B16F10 tumour growth in mice. The novelty of our work concerns i) mRNA formulation with a PEGylated histidine-rich polylysine and L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide liposomes, ii) generation of mRNA lipopolyplexes and iii) their use to vectorize mRNA encoding a tumour antigen allowing immunization of mice against tumour growth. We formulated MART1 mRNA with two pH-sensitive histidylated carriers to increase the protection of mRNA from nuclease digestion, to prolong its stability in the blood circulation and to promote its cytosolic delivery in APC. Histidine residues carried both by the cationic polymer and liposomes probably mediate endosome escape of mRNA. We found that MART1 mRNA condensed with PEGylated histidine-rich polylysine and then encapsulated in histidylated liposomes (lipopolyplexes) gave the most consistent vaccination of mice against B16F10 melanoma. mRNA lipopolyplexes were much more effective than mRNA formulated with either the polymer or the liposomes alone. The mouse B16F10 melanoma is a poorly immunogenic and highly metastatic tumour model. B16F10 cells express the murine counterpart of the human MelanA/MART1 antigen, sharing a 68.6% amino acid sequence identity.<sup>24</sup> MART1, an intracellular membrane protein located in the endoplasmic reticulum, is evidenced only upon permeation of B16F10 cells. The human MART1 antigen is capable to induce an immune response against the murine B16 melanoma. Indeed, mouse dendritic cells genetically modified to express the human MART1 antigen have been reported to generate potent murine MART1-specific protective responses to B16 melanoma.<sup>25-27</sup> Based on the absence of any observed effect with MART1 mRNA/PEG-HpK or MART1 mRNA/liposomes, the transfection reagents (i.e. PEG-HpK and HDHE:chol liposomes) are supposed to induce no adjuvant effect to the immunogenicity of the above mRNA vaccine. The weak effect observed with Luc mRNA lipopolyplexes might come from an adjuvant effect of the polymer/liposomes combination or a non specific immune response due to the expression of the firefly luciferase. Moreover, a Toll-like receptor-dependent activation induced by the RNA molecule per se could generate a non-specific immunostimulation too.<sup>28</sup> Compared to MART1 mRNA lipopolyplexes, no significant inhibition of tumour growth was obtained with lipopolyplexes containing pCMV-MART1 plasmid DNA. This data documents the advantages of mRNA transfer and the occurrence of translation mechanism in the cytosol over DNA-based transfection in non-dividing cells requiring the nuclear machinery for MART1 gene expression.

mRNA/PEG-HpK polyplexes in solution exhibited a spherical shape of ~145 nm in diameter. While this size was similar to that measured for complexes between a 5kb plasmid DNA and PEG-HpK, the resulting mRNA polyplexes did not form rods and toroids.<sup>15</sup> The size and structure of the mRNA molecules, different from those of a plasmid DNA, could explain such difference in shape. Knowing that 100 - 150 nm DNA/polylysine and DNA/PEI polyplexes may contain up to four plasmid molecules, PEG-HpK is also likely to condense several mRNA molecules.<sup>29,30</sup> The structural analysis of lipopolyplexes by electron microscopy showing dense inside core concludes to encapsulation of mRNA-polyplexes within the aqueous compartments of the liposomes. According to DLS and TEM size measurements, encapsulation of one mRNA-polyplex particle is likely to occur. However, compaction of mRNA may also occur and could lead to encapsulation of more than one polyplex. Entrapment of mRNA/PEG-HpK polyplexes into the cationic HDEH:chol liposomes was due to the weakly positive polyplex charge, consequent to the presence of PEG molecule on the cationic polymer. Therefore, cationic liposomes can interact with polyplexes leading to their entrapment. Similar polyplex entrapment has been reported with positively charged DNA/polylysine complexes and anionic liposomes.<sup>31</sup> In contrast, repulsive forces are unlikely to favour interaction between cationic polyplexes and cationic liposomes and thus polyplex encapsulation. Indeed, we did not observe vesicles containing a high electron density core under TEM upon mixing mRNA/HpK complexes with HDEH:chol liposomes (data not shown). The diameter of particles determined by DLS was lower than that found by TEM. In fact, DLS measurements were obtained with hydrated particles whereas they are dried for TEM which gives only qualitative information on the complex morphology. Indeed, size changes can occur during drying. Moreover, the apparent smaller size on TEM may also come from interaction of particles on the carbon film promoting dissociation in some smaller aggregates. For polyplexes, acidification during uranyl acetate treatment could increase mRNA condensation due to the presence of a higher number of cationic charges on the polymer upon imidazole protonation. Polyplex entrapment presumably reduced the global charge of the resulting vesicles because the  $\zeta$  potential of the lipopolyplex solution containing both empty and full liposomes decreased. Compared to empty liposomes or lipopolyplexes, the biodistribution of lipopolyplexes with a reduced charge is likely modified. Based on the biodistribution of radiolabeled DNA, we have found that the DNA was blocked in the lung once DNA/HpK complexes or DNA/HDHE:chol complexes were injected in tail vein of mice (our unpublished results). In contrast, DNA passed the lung and concentrated in the liver and spleen with DNA/PEG-HpK or DNA/PEG-HpK/HDHE:chol complexes (our unpublished results). Thus, mRNA lipopolyplexes and PEG-HpK polyplexes can be captured by hepatic and splenic APC.



The mRNA transfection efficiency not only depends on the amount of mRNA delivered in the cytosol of APC but also on whether the mRNA molecule is released from the vectors. Histidine-rich polypeptides and HDHE:chol liposomes promote membrane permeation and fusion in acidic medium.<sup>16,29,32</sup> With mRNA/PEG-HpK/HDHE:chol lipopolyplexes, a synergistic membrane destabilization effect could increase the endosome escape of mRNA inside APC. Histidine containing polymers such as [His-Lys]<sub>19-29</sub> polypeptides have been reported to increase DOTAP liposome-mediated DNA transfection upon intratumor injection in mice.<sup>33,34</sup> The absence of immunization with MART1 mRNA/PEG-HpK polyplexes could come from either their capture in non acidic vesicles or the high stability of these electrostatic complexes. Bettinger et al., have reported that polyethyleneimine (PEI) of high degree of polymerisation failed to mediate substantial levels of mRNA transfection.<sup>35</sup> PEI as well as HpK polymers with a high number of positive charges may form too stable complexes to undergo translation of the mRNA. In contrast, mRNA complexed with a PEI of low degree of polymerisation mediated substantial levels of mRNA transfection.

Lipopolyplexes appear to be promising vectors for nucleic acids delivery. Huang et al., have developed Liposome-Polycation-DNA (termed LPD) particles for gene delivery: e.g. either cationic liposomes (DOTAP:cholesterol) plus protamine sulfate<sup>36,37</sup> or pH-sensitive liposomes (DOPE/cholesteryl hemisuccinate) plus polylysine.<sup>31</sup> LPD has been also used as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines.<sup>38-41</sup> When the human papillomavirus E749-57 peptide epitope or the 16E7 protein was incorporated in LPD particles both anti-cancer immunization and eradication of tumour established in mice has been obtained.<sup>38,39</sup> In these cases, plasmid DNA containing CpG motifs acted as a TLR9-mediated adjuvant. Concerning mRNA immunization with lipopolyplexes, there was only one report showing that Liposomes (Unifectin)/protamine/mRNA complexes primed CTL responses against *E. Coli*  $\beta$ -galactosidase.<sup>14</sup>

## CONCLUSION

The distinguished features of the mRNA-lipopolyplex formulation described herein and most importantly the findings that successful anti-B16 immunization was realized only with mRNA lipopolyplexes make these novel class of lipopolyplexes important next generation non-viral vectors for future use in mRNA-based tumor vaccination. Studies aimed at characterizing the anti-B16 melanoma immune response induced by MART1 mRNA/PEG-HpK/HDHE:Chol lipopolyplexes are currently in progress.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to A Bonehill, K. Thielemans and Van den Eynde for the kind gift of the pGEM4Z-[MART1]-A64 and pCMVMART1 plasmids. We thank warmly Erika Bourseau<sup>1</sup> for mRNA preparation, H. Meudal<sup>1</sup> for NMR spectra, I. Mercier-Maillet<sup>2</sup> and L. Janot<sup>2</sup> for the excellent technical assistance and advice. This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer Région Centre and Canceropole Grand Ouest. M.M was a recipient of a fellowship from Ministère de la recherche.

## REFERENCES

- (1) Donnelly, J. J.; Wahren, B.; Liu, M. A. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 2005, 175, 633-639.
- (2) Cui, Z. DNA vaccine. *Adv Genet* 2005, 54, 257-289.
- (3) Kikuchi, T. Genetically modified dendritic cells for therapeutic immunity. *Tohoku J Exp Med* 2006, 208, 1-8.
- (4) Ribas, A.; Butterfield, L. H.; Glaspy, J. A.; Economou, J. S. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol* 2003, 21, 2415-2432.
- (5) Ribas, A.; Butterfield, L. H.; Glaspy, J. A.; Economou, J. S. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr Gene Ther* 2002, 2, 57-78.
- (6) Ribas, A. Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Curr Gene Ther* 2005, 5, 619-628.
- (7) Esslinger, C.; Romero, P.; MacDonald, H. R. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors. *Hum Gene Ther* 2002, 13, 1091-1100.
- (8) Gilboa, E.; Vieweg, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004, 199, 251-263.
- (9) Gilboa, E. The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 2004, 4, 401-411.
- (10) Kavanagh, D. G.; Kaufmann, D. E.; Sunderji, S.; Frahm, N.; Le Gall, S. et al. Expansion of HIV-specific CD4+ and CD8+ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood* 2006, 107, 1963-1969.
- (11) Martinon, F.; Krishnan, S.; Lenzen, G.; Magne, R.; Gomard, E. et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 1993, 23, 1719-1722.
- (12) Zhou, W. Z.; Hoon, D. S.; Huang, S. K.; Fujii, S.; Hashimoto, K. et al. RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther* 1999, 10, 2719-2724.
- (13) Hess, P. R.; Boczkowski, D.; Nair, S. K.; Snyder, D.; Gilboa, E. Vaccination with mRNAs encoding tumor-associated antigens and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor efficiently primes CTL responses, but is insufficient to overcome tolerance to a model tumor/self antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55, 672-683.
- (14) Hoerr, I.; Obst, R.; Rammensee, H. G.; Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* 2000, 30, 1-7.
- (15) Pichon, C.; Goncalves, C.; Midoux, P. Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 53, 75-94.
- (16) Kumar, V. V.; Pichon, C.; Refregiers, M.; Guerin, B.; Midoux, P. et al. Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. *Gene Ther* 2003, 10, 1206-1215.
- (17) Singh, R. S.; Goncalves, C.; Sandrin, P.; Pichon, C.; Midoux, P. et al. On the gene delivery efficacies of pH-sensitive cationic lipids via endosomal protonation: a chemical biology investigation. *Chem Biol* 2004, 11, 713-723.
- (18) Mockey, M.; Goncalves, C.; Dupuy, F. P.; Lemoine, F. M.; Pichon, C. et al. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 340, 1062-1068.
- (19) Midoux, P.; Monsigny, M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem* 1999, 10, 406-411.
- (20) Tuyaerts, S.; Michiels, A.; Corthals, J.; Bonehill, A.; Heirman, C.; de Greef, C.; Noppe, S.M.; Thielemans, K. Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 2003, 10, 696-706.
- (21) Stepinski, J.; Waddell, C.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E.; Rhoads, R. E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *Rna* 2001, 7, 1486-495.
- (22) Le Cam, E.; Coulaud, D.; Delain, E.; Petitjean, P.; Roques, B. P. et al. Properties and growth mechanism of the ordered aggregation of a model RNA by the HIV-1 nucleocapsid protein: an electron microscopy investigation. *Biopolymers* 1998, 45, 217-229.

- (23) Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999, 6, 595-605.
- (24) Zhai, Y.; Yang, J. C.; Spiess, P.; Nishimura, M. I.; Overwijk, W. W. et al. Cloning and characterization of the genes encoding the murine homologues of the human melanoma antigens MART1 and gp100. *J Immunother* 1997, 20, 15-25.
- (25) Ribas, A.; Butterfield, L. H.; Hu, B.; Dissette, V. B.; Chen, A. Y. et al. Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *J Immunother* 2000, 23, 59-66.
- (26) Ribas, A.; Butterfield, L. H.; McBride, W. H.; Jilani, S. M.; Bui, L. A. et al. Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res* 1997, 57, 2865-2869.
- (27) Broder, H.; Anderson, A.; Kremen, T. J.; Odesa, S. K.; Liao, L. M. MART-1 adenovirus-transduced dendritic cell immunization in a murine model of metastatic central nervous system tumor. *J Neurooncol* 2003, 64, 21-30.
- (28) Scheel, B.; Teufel, R.; Probst, J.; Carralot, J. P.; Geginat, J. et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005, 35, 1557-1566.
- (29) Midoux, P.; LeCam, E.; Coulaud, D.; Delain, E.; Pichon, C. Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2002, 27, 27-47.
- (30) Clamme, J. P.; Azoulay, J.; Mely, Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2003, 84, 1960-1968.
- (31) Lee, R. J.; Huang, L. Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem* 1996, 271, 8481-8487.
- (32) Midoux, P.; Kichler, A.; Boutin, V.; Maurizot, J. C.; Monsigny, M. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem* 1998, 9, 260-267.
- (33) Chen, Q. R.; Zhang, L.; Stass, S. A.; Mixson, A. J. Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes. *Gene Ther* 2000, 7, 1698-1705.
- (34) Chen, Q. R.; Zhang, L.; Luther, P. W.; Mixson, A. J. Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles. *Nucleic Acids Res* 2002, 30, 1338-1345.
- (35) Bettinger, T.; Carlisle, R. C.; Read, M. L.; Ogris, M.; Seymour, L. W. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res* 2001, 29, 3882-3891.
- (36) Li, S.; Rizzo, M. A.; Bhattacharya, S.; Huang, L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther* 1998, 5, 930-937.
- (37) Holder, E.; Griesenbach, U.; Li, S.; Huang, L.; Rogers, D. F. et al. Intravenously administered oligonucleotides can be delivered to conducting airway epithelium via the bronchial circulation. *Gene Ther* 2006.
- (38) Dileo, J.; Banerjee, R.; Whitmore, M.; Nayak, J. V.; Falo, L. D., Jr. et al. Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery to antigen-presenting cells results in enhanced anti-tumor immune responses. *Mol Ther* 2003, 7, 640-648.
- (39) Cui, Z.; Huang, L. Liposome-polycation-DNA (LPD) particle as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines: therapeutic effect against cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54, 1180-1190.
- (40) Sloat, B. R.; Cui, Z. Strong mucosal and systemic immunities induced by nasal immunization with anthrax protective antigen protein incorporated in liposome-protamine-DNA particles. *Pharm Res* 2006, 23, 262-269.
- (41) Sloat, B. R.; Cui, Z. Evaluation of the immune response induced by a nasal anthrax vaccine based on the protective antigen protein in anaesthetized and non-anaesthetized mice. *J Pharm Pharmacol* 2006, 58, 439-447.

**Vaccin antitumoral par transfert d'ARNm:  
Protection contre la progression et les métastases du  
mélanome B16 par vaccination à l'aide  
de lipopolyplexes histidylés d'ARNm MART1.**

# **mRNA-based cancer vaccine : Prevention of B16 melanoma progression and metastasis by MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes vaccination.**

Michael Mockey, <sup>1</sup> Erika Bourseau, <sup>1</sup> Voshavar Chandrashekhar, <sup>3</sup> Arabinda Chaudhuri, <sup>3</sup> Valérie F.J. Quesniaux, <sup>2</sup> Bernhard Ryffel, <sup>2</sup>, Chantal Pichon, <sup>1</sup> Patrick Midoux, <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France

<sup>2</sup> Institut de Transgénose, Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire, CNRS UMR 6218, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans cedex 2, France

<sup>3</sup> Division of Lipid Science and Technology Indian Institute of Chemical Technology Hyderabad- 500 007, India

**\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [midoux@cnrs-orleans.fr](mailto:midoux@cnrs-orleans.fr)**

Running title : mRNA histidylated lipopolyplexes as cancer vaccine

**Key words : RNA ; polylysine ; liposomes ; cationic lipids; histidine ; melanoma ; MelanA ; MART1 ; vaccine**

**Abbreviations :** APC : Antigen presenting cell; ARCA : Anti-Reverse Cap Analogue; BSA : Bovine serum albumin; chol : cholesterol; CMV : Cytomegalovirus; CTL : Cytotoxic T lymphocyte; Cy5 : Cyanine 5; DC : Dendritic cell; DIEA : N,N Diisopropylethylamine; EDTA : Ethylenediamine tetraacetate; FITC : Fluorescein thiocarbamyl residu; HDHE : L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide; HpK : Histidylated polylysine; IVT : in vitro transcribed; LN : Lymph Node; LUC : luciferase; MHC : Major histocompatibility complex; PBS : Phosphate buffer saline; pDNA : Plasmid DNA; PEG : Polyethylene Glycol; TLR : Toll-like receptor; UTR : untranslated region;

*Submitted to "Cancer Immunology, Immunotherapy"*

## Abstract

The injection of mRNA encoding tumour antigen appears to be a promising vaccine strategy for cancer. For this purpose, the melanoma-associated antigen MART1 mRNA was formulated as histidylated lipopolyplexes made with a PEGylated derivative of histidylated polylysine and L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide. The ternary polymer/lipids/nucleic acid complexes comprised one mRNA/polymer complex encapsulated by the liposomes. The originality of these pH-sensitive histidylated molecules concerns their fusogenic property in an acidic medium such as in the lumen of endosomes which favours the cytosolic delivery of nucleic acids, and their low toxicity. Mice challenged with B16F10 melanoma cells were specifically and significantly ( $P < 0.01$ ) protected against tumour progression after vaccination by systemic injections of MART1 mRNA lipopolyplexes. This protective effect was induced only with mRNA carrying a poly(A) tail length of 100 adenosine residues at an optimal mRNA dose of 12.5  $\mu\text{g}$ . No significant protection was obtained with lipopolyplexes containing a plasmid DNA encoding MART1 antigen. MART1 mRNA lipopolyplexes vaccine elicited a Th1 immune response characterized by a production of IFN- $\gamma$  and an induction of cytotoxic T cell activity. Finally, using sig-MART1-LAMP1 mRNA to target to the MHC class II compartments together with MART1 mRNA, the anti-melanoma response was enhanced. These studies demonstrate that mRNA histidylated lipopolyplexes are of interest and must be considered for mRNA-based cancer vaccine.

## Introduction

The injection of genetic material encoding tumour antigen appears to be a promising vaccine strategy for cancer (For reviews see: [1]). The antigen expression in its native molecular state into APC will allow its processing and direct the presentation of all peptide epitopes. The peptides that associate with MHC class I molecules for presentation to CD8<sup>+</sup> lymphocytes are expected to promote specific cellular responses against tumour cells. For this purpose, the occurrence of translation mechanism in the cytosol offers advantages to mRNA transfer over DNA-based transfection in non-dividing cells. mRNA are quickly translated in all cell types and allow the immediate expression of the selected protein over few hours. No uncontrolled long-term expression of the antigen is expected to occur as with the integration of DNA-vaccine in the cell genome. Moreover, mRNA do not bear any regulatory DNA sequences (promoters, terminators, enhancer, etc) and no antibiotic-resistance genes are injected. Over recent years, it has been clearly demonstrated that a CTL-mediated anti-tumour response is induced by dendritic cells transfected *ex vivo* with either mRNA from tumour cells or *in vitro* transcribed (IVT) tumour-activated antigen mRNA (For a review see [2, 3]). Conversely, little has been reported concerning direct immunization with IVT mRNA. First, mRNA which is less nuclease resistant than DNA must be protected from degradation, and their cellular uptake and transfection efficiency improved. To address this purpose, the use of cationic liposomes/mRNA and cationic peptide/mRNA complexes has been reported. The injection in mice of liposomes/influenza virus nucleoprotein mRNA [4], liposomes/human melanoma-associated antigen gp100 mRNA [5], liposome/ovalbumin mRNA [6] and protamine/  $\beta$ -galactosidase mRNA [7] complexes were found to prime CTL responses. We have designed histidine-rich cationic polymers (For a review see: [8]) and histidylated cationic lipids [9, 10] to deliver nucleic acids. Their originality concerns their fusogenic property in an acidic environment such as the lumen of endosomes favouring the cytosolic delivery of nucleic acids. Recently, we have optimised an mRNA construct (termed ARCA-mRNA-A100) allowing a high level of protein upon lipofection of dendritic cells [11]. This mRNA was capped with 3'-O-methyl-m<sup>7</sup>Gppp<sup>5'</sup>G (Anti-Reverse Cap Analogue; ARCA) and bore a Poly(A) tail of at least 100 adenosines *in cis*.

Here, we report on the use of the above-mentioned mRNA construct and the histidylated vectors in immunizing mice against B16F10 melanoma directly with the IVT mRNA of the human melanoma MART1 (MelanA) antigen. The mouse B16F10 melanoma is a poorly immunogenic and highly metastatic tumour model in C57BL/6 mice. B16F10 cells express the murine counterpart of the human MART-1/Melan-A (MART-1) antigen, sharing a 68.6% amino acid sequence identity [12]. The human MART-1 antigen has been reported to induce an immune response against the murine B16 melanoma. Indeed, mouse dendritic cells



genetically modified to express the human MART-1 antigen were able to generate potent murine MART-1-specific protective responses to B16 melanoma [13-15].

We found that only IVT MART-1 mRNA formulated as lipopolyplexes (i.e. a mRNA complexed with a PEGylated histidine-rich polylysine and encapsulated by histidylated liposomes) exhibited a significant delayed B16 melanoma growth. This protective effect varied with the mRNA dose and with its poly(A) tail length. No significant tumour growth inhibition was obtained with lipopolyplexes containing plasmid DNA encoding MART1 antigen indicating that mRNA-transfer was more efficient than DNA-transfer. The immune response induced by MART1 mRNA lipopolyplexes was characterized by a CTL-mediated anti-B16 melanoma response. Finally, the anti-melanoma response was enhanced when was used the mixture of MART1 mRNA and MART1 mRNA encoding the antigen targeted to the MHC class II compartments by the lysosomal sorting signal of human LAMP1 protein.

## Materials and Methods

All reagents were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise.

### Animals and cell lines

Nine to eleven-week old C57BL/6 (H-2K<sup>b</sup>) adult mice were bred in a specific pathogen-free animal facility. Mice were kept in isolated ventilated cages and all experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations. B16/F10 cells (ATCC CRL 6475) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies), 100 Units/ml penicillin (Life Technologies) and 100 Units/ml streptomycin (Life Technologies).

### Plasmids

pGEM-4Z/MART1/A64 and pGEM-4Z/sig-MART1-LAMP1/A64 plasmids DNA encoding the human MelanA/MART-1 melanoma antigen under the T7 RNA polymerase promoter of  $\lambda$  bacteriophage were kindly given by Dr A. Bonehill and Dr K. Thielemans (Medical School of the Vrije Universiteit Brussels, Brussels, Belgium). pGEM-4Z/sig-MART1-LAMP1/A64 encodes the chimeric MART1 protein carrying the peptide signal and lysosomal sorting signal of human LAMP1 protein. Those signal sequences have high homology with those of mice [16, 17]. pGEM-4Z/LUC/A64 encoding the firefly Luciferase gene under the T7 RNA polymerase promoter of  $\lambda$  bacteriophage was constructed as previously described [11]. pCMVMART-1 plasmid DNA encoding the human MelanA/MART-1 antigen under control of the human cytomegalovirus promoter was kindly given by Dr Van den Eynde (Ludwig Institute for cancer research, Brussels, Belgium). Plasmids were propagated in DH5 $\alpha$  supercompetent *Escherichia coli* (InVitrogen, Cergy Pontoise, France) and were purified on endotoxin-free Qiagen-tip 500 columns (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France).

### In vitro mRNA transcription

Plasmids were linearized with *SpeI* (InVitrogen) and used as DNA templates for the *in vitro* transcription reaction as previously described [11]. Briefly, ARCA-mRNA were obtained after transcription with the T7 mMessage mMachine kit (Ambion, Oxfordshire, UK) allowing a capping with 3'-O-methyl m<sup>7</sup>Gppp<sup>5</sup>G. mRNA polyadenylation was performed with the Poly(A) tailing kit (Ambion). mRNA was purified by DNase I digestion, followed by a phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction and an isopropanol precipitation. mRNA were dissolved in RNase-free water at 1 mg/ml. The quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis upon mRNA denaturation at 65°C for 10 min in formaldehyde-glycerol

loading buffer. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm using 1UA=40 µg/ml. RNA was stored at –80°C in small aliquots in polypropylene cryotubes.

### **PEG-HpK**

Histidylated polylysine (HpK) (250 mg; 3.5 µmol in 3 ml DMSO) prepared as previously described [18] was coupled with mPEG molecule of 5 KDa upon reaction for 4h at 20°C with the N-hydroxysuccinimide derivative of the mPEG-propionic acid (29 mg; 5 µmol) (mPEG-SPA, Shearwater, Huntsville, AL, USA) in the presence of DIEA (116 µl; 850 µmol). The polymer was precipitated in ethyl acetate, spun down by centrifugation (1800 g for 15 min), solubilized in distilled water and freeze-dried. About 0.8 PEG molecule was bound per polymer molecule as calculated from the <sup>1</sup>H NMR peak intensity ratio of the methylene protons at = 3.5 ppm of PEG to those of the lysyl side chain at 1.2-1.3 ppm.

### **HDHE:chol liposomes**

A lipid film was prepared under nitrogen by drying an ethanol solution of 5.4 mM of L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide (HDHE) and cholesterol (molar ratio of 1 : 2) [9]. The film was hydrated with 1 ml sterile RNase-free water (Sigma), vortexed for 3 min and allowed to stand for 2 h at 4°C. The mixture was then vortexed and sonicated for 15 min at 37 kHz using a Bioblock ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France).

### **Endotoxin**

The presence of endotoxin in polymer, lipids and mRNA was less than 0.1 EU/ml as evaluated by *Limulus Amebocyte* lysate test method using QCL-1000 kit (Cambrex, Walkersville, US).

### **Polyplexes, Lipoplexes and Lipopolyplexes**

Formulations were done in polypropylene tubes. mRNA (1 mg/ml) sample were completed to 150 µl with RNase-free water. Polyplexes were prepared at a RNA / polymer ratio of 1:3 (µg : µg) by adding PEG-HpK (75 µg in 50 µl water) to mRNA or pDNA (25 µg in 125 µl water), mixed for 4 sec and stood for 30 min at 20°C. Lipoplexes were obtained at a RNA / lipids ratio of 1 / 2 (µg : µg) by adding mRNA (25 µg in 125 µl water) to 25 µl liposomes (50 µg in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4) and the solution was stood for 15 min at 20°C. Lipopolyplexes were formed at a RNA / polymer / lipids ratio of 1 / 3 / 2 (µg : µg : µg) by adding liposomes (25 µl; 50 µg) to the polyplex preparation, mixed gently and kept for 15 min at 20°C. For injection in mice, the solutions were diluted to 320 µl with water and adjusted to 0.15 M NaCl with a 3 M NaCl solution.

### **Tumour and metastasis challenge experiments**

Polyplexes, lipoplexes, lipopolyplexes or NaCl 0, 9% were injected twice at 1-week intervals into the tail vein of the mice. One week after the second injection, mice were challenged subcutaneously in the back with 10<sup>5</sup> B16/F10 cells in 100 µl of PBS. Mice were monitored every 2 days and tumour size was measured using a calliper. Tumour volume (V)

was expressed as the half of the square of the smallest diameter ( $l$ ) multiplied by its largest diameter ( $L$ ):  $V = L \times l^2 / 2$ . Animals that developed tumours with  $L > 10$  mm were euthanized for ethical's reasons. Lung metastases were generated by i.v. injection of  $10^5$  B16/F10 cells in 100  $\mu$ l of PBS one week after the second immunization. Mice were killed 14 days after challenge and the number of macroscopically visible melanoma metastases on the surface of the lungs was counted and measured in a blind fashion by two different experimenters.

#### **Anti-B16 antibody detection.**

B16/F10 cells were harvested, washed with PBS, permeabilized and fixed for 30 min at  $-20^\circ\text{C}$  in 9 volumes of cold methanol. After several washings with PBS containing 1% BSA, cells were incubated for 20 min at  $20^\circ\text{C}$  in PBS, BSA 1% containing 1/50 diluted serum from pre- or post-B16/F10 challenged mice. Then, cells were washed twice in PBS, BSA 1% and incubated for 20 min at  $20^\circ\text{C}$  in PBS, BSA 1% containing Cy5-labelled anti-mouse IgG (H+L) secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, US) diluted at 1/250. After washing, the fluorescence intensity of cells was measured by flow cytometry (emission wavelength = 680 nm; excitation wavelength = 633 nm).

#### **CTL response**

Single cell suspensions from afferent lymph node (LN) and spleen from mice were obtained 7 days after immunization by passing on Histopaque 1.083 gradient. Freshly isolated cells ( $10^7$  cells) were restimulated by co-cultured at  $37^\circ\text{C}$  in 6-well plates with B16/F10 cells ( $10^6$  cells) previously inactivated by incubation for 1h at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  mitomycin C. Cells were cultured in 5 ml RPMI-1640 medium containing 10% FCS (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Life Technologies), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies), 1 mM amino acids (Life Technologies), 100 Units/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies) and 50 Units/ml mouse recombinant IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, US).

The CTL response was measured after 3 days restimulation. Serial dilutions of effectors (splenocytes and LN cells) were incubated in triplicate for 5 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  in the presence of  $5 \times 10^3$  untreated B16/F10 cells (target cells) in 100  $\mu$ l medium in 96-well, U-bottomed plates. The cytotoxicity of the supernatant was then measured by using the lactate dehydrogenase (LDH) colorimetric assay according to the manufacturer's instructions (CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega). Briefly, supernatants (50  $\mu$ l) were mixed with 50  $\mu$ l of reconstituted substrates in each well of a 96-well plate and the incubation was carried out for 30 min at room temperature in the dark. The absorbance at 490 nm was measured using a microplate spectrophotometer (1420 Multilabel Counter Victor, Wallac). The percentage of lysis was calculated from the formula:  $100 \times (S-M) / (W-M)$ , where  $M$  and  $S$  were the absorbance in the presence of the medium alone and of the

supernatant, respectively. *W* was the maximum release determined by adding 10 µl of Triton X-100 lysis solution before collecting supernatant.

### **IFN- $\gamma$ secretion**

Freshly isolated LN and spleen cells ( $10^7$  cells) were co-cultured with  $10^6$  B16/F10 cells for 20h at 37°C in 6-well plates. The IFN- $\gamma$  secretion assay was performed using Miltenyi Biotec mouse IFN- $\gamma$  secretion assays-detection kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Paris, France). Non-adherent cells were collected and washed with PBS containing 0.5 % BSA and 2mM EDTA (PSE). Cells ( $10^6$ ) were incubated for 10 min at 4°C in cold culture medium containing 10 µl of IFN- $\gamma$  catch reagent. Coated cells were then incubated for 45 min at 37°C in 1ml medium. After several PSE washings, cells were incubated for 10 min at 4°C in PSE containing FITC- labelled anti-mouse CD4 antibodies (clone GK1.5, Miltenyi Biotec) diluted ten times or FITC-labelled anti-mouse CD8 antibodies (clone 53-6.7, BD Pharmingen, San Diego, CA) diluted 100 times and PE-labelled anti-mouse IFN- $\gamma$  antibodies (Miltenyi Biotec) diluted 10 times. The cell fluorescence intensity was analysed by flow cytometry. The lymphocyte population was gated on the Forward-Scatter and Size-Scatter, and fluorescence intensity of 10.000 cells was measured at 520 nm and 585 nm upon excitation at 488 nm.

### **Statistical analysis**

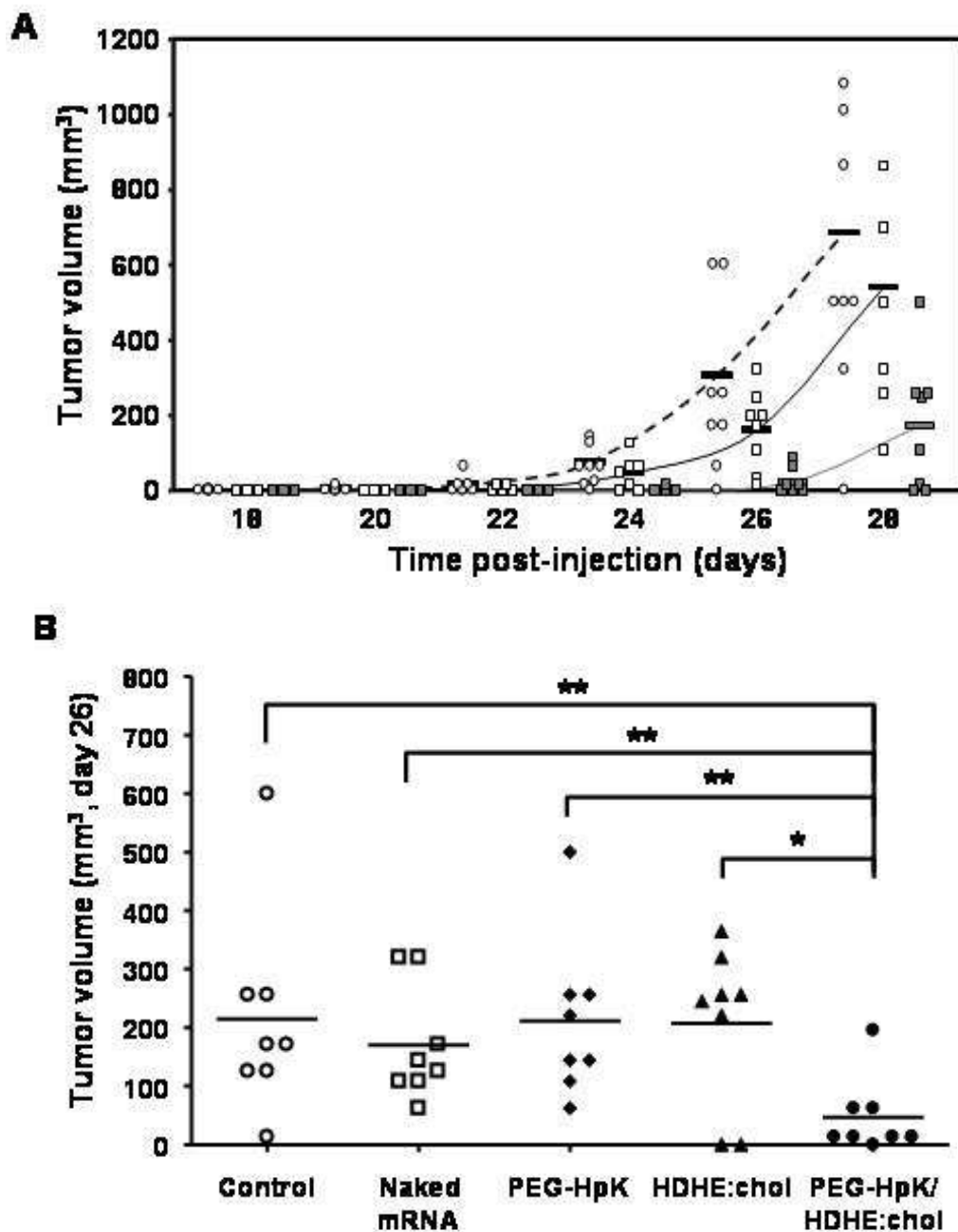
Statistical evaluation of differences between experimental groups was determined by Mann-Witney "U" test for non-viral vectors comparison experiments and Student's *t*-test for other data using Prism software. *P* values < 0.05 were statistically significant.

## Results

### **MART1 mRNA lipopolyplexes induce protection against B16 melanoma.**

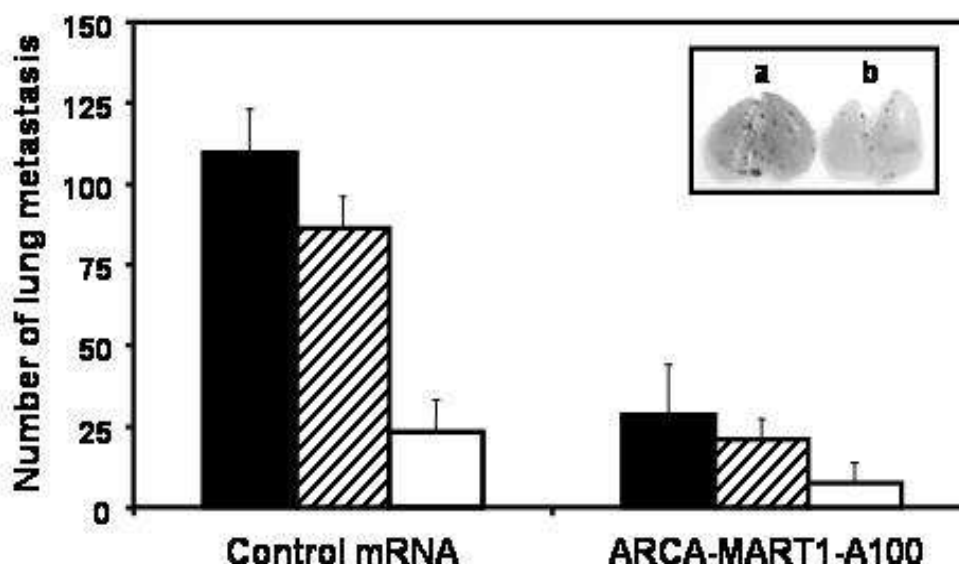
To determine the vaccine effect of IVT MART1 mRNA against melanoma cancer, ARCA-MART1-A100 mRNA construct was complexed with histidine-rich polylysine (PEG-HpK) and histidylated liposomes (HDHE:chol) to protect it from nuclease digestion in serum and to enhance its cytosolic delivery in APC. The size and  $\zeta$  potential of the resulting electrostatic complexes indicated that polyplexes and lipopolyplexes exhibited a size ( $\zeta$  potential) of ~145 nm (7 mV) and ~350 nm (-37 mV), respectively ; the global charge of lipopolyplexes was 17 mV and there were two types of vesicles of 125 nm and 325 nm in diameter (Mockey et al., submitted). Polyplexes, lipopolyplexes or lipopolyplexes were injected in mice on days 0 and 7 by *i.v.* injections of 25  $\mu$ g of either naked MART1-mRNA or the above-mentioned MART1-mRNA formulations. LUC mRNA (ARCA-LUC-A100) encoding LUCiferase was used as irrelevant mRNA and similar formulations containing this mRNA were also injected as controls. At day 14, mice were subcutaneously challenged with  $10^5$  B16/F10 cells and the tumour growth was measured every 2-days up to 28 days post-mRNA injection. The tumour volume increased with time in control mice and reached a large volume at day 28 when the mice were sacrificed (Figure 1A). A protective effect against the tumour growth occurred in mice receiving MART1 mRNA lipopolyplexes. There was no significant difference between control mice and those which received LUC mRNA lipopolyplexes. This protective effect was specific and dependent on the mRNA sequence because no significant protection was observed in LUC mRNA lipopolyplex-treated mice.

Figure 1B summarizes the tumour volume at day 26 as a function of the injected mRNA formulations. Neither naked MART1 mRNA nor MART1 mRNA complexed with PEG-HpK or HDHE:chol liposomes had significant effect on the tumour growth compared to the control group. An inhibition of the tumour proliferation was clearly obtained when mice received MART1 mRNA complexed with both PEG-HpK and HDHE:chol liposomes. Altogether, these results indicated that systemic injections of MART1 mRNA lipopolyplexes induced a specific protection against B16 melanoma growth.



**Figure 1: Antitumoral efficiency of MART1 mRNA histidine-rich polyplexes, lipoplexes or lipopolyplexes.**  
**(A)** Mice were immunized i.v. on days 0 and 7 with PEG-HpK/HDHE:chol lipopolyplexes containing 25  $\mu$ g of ARCA-MART1-A100 (filled square) or irrelevant ARCA-LUC-A100 (open square) mRNA. Solution of NaCl 0.9 % was used as control (open circle). On day 14, mice were subcutaneously challenged with  $10^5$  B16/F10 cells and tumour volumes were measured every 2-days. Data of individual mice and mean (curve) of volume tumour are shown and are from  $n = 8$  mice per group from two independent experiments.  
**(B)** Summary of tumour volumes measured on day 26 for individual mice or mean of  $n = 8$  mice from two independent experiments. Mice were immunized with either a NaCl 0.9 % solution (open circle), naked ARCA-MART1-A100 mRNA (open square) or ARCA-MART1-A100 mRNA complexed with PEG-HpK polymers (closed diamond), HDHE:chol liposomes (closed triangle) or with polymer and liposomes (closed circle). On day 14, mice were subcutaneously challenged with  $10^5$  B16/F10 cells. Statistical analysis was performed (Mann-Whitney test): \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

We then assessed whether MART1 mRNA lipopolyplexes would protect mice from lung metastases. Seven days after the second injection of mRNA lipopolyplexes, mice were intravenously challenged by  $10^5$  B16/F10 cells known to promote lung invasion. Mice were killed 14 days later, the lungs removed, and macroscopically visible metastasis counted and measured. As shown in Figure 2, immunization with MART1 mRNA lipopolyplexes drastically reduced by 75% the total number of lung metastases. In the control group (LUC mRNA lipopolyplexes) a mean of 119 ( $\pm 13$ ) melanoma lung metastases was counted *versus* 29 ( $\pm 15$ ) in the MART1 mRNA-treated group. The reduction of the metastasis number did not affect the size distribution of metastases between those two groups. Indeed, 80% ( $\pm 10$ ) of small metastases (< 2 mm) were found in the control group and 73% ( $\pm 6$ ) in the MART1 group. Overall, these data showed that the immunization with MART1 mRNA lipopolyplexes was also able to reduce lung metastasis formation.



**Figure 2: Protection against lung melanoma metastases by MART1 mRNA lipopolyplexes.**

Mice were immunized i.v. on days 0 and 7 with PEG-HpK/HDHE:chol lipopolyplexes containing 25 $\mu$ g of ARCA-MART1-A100 or ARCA-LUC-A100 mRNA (control mRNA) and i.v. challenged by  $10^5$  B16/F10 on day 14. Insert : mRNA-treated mice lungs were removed on day 28. (a) and (b) are representative lung from mice immunized with MART1 and LUC mRNA, respectively. Then, the number of total (filled bar), small (< 2 mm, hashed bar) and large (> 2 mm, open bar) macroscopically visible metastasis were counted by two different experimenters. Data are the average of counting ( $\pm$  S.D) of four mice per group.

### **Influence of mRNA Poly(A) tail length on tumour protective effect.**

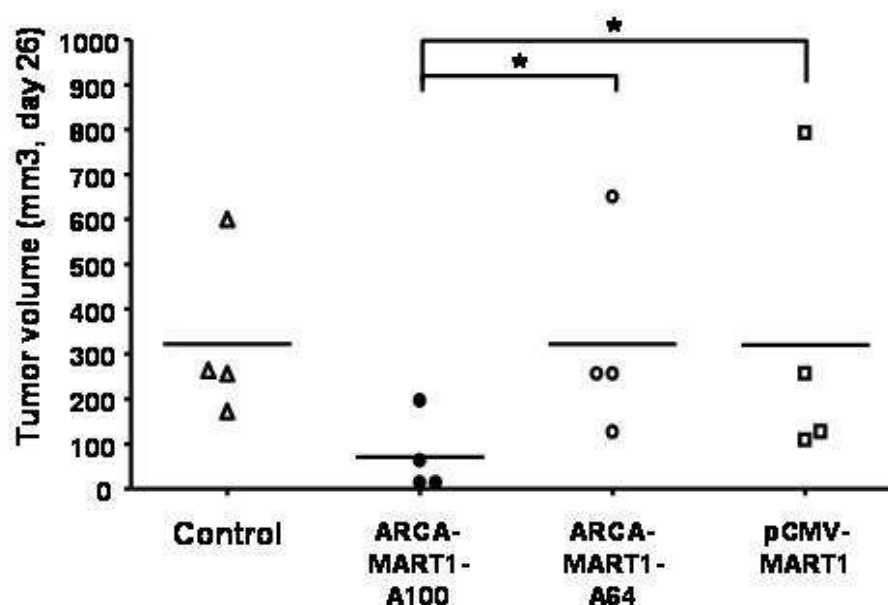
The length of the Poly(A) tail of mRNA which is important for both mRNA translation and stability could influence the level of the antigenic protein production, the level of the antigen presentation and the immune response. Indeed, we have reported that *in vitro* mRNA-lipofection of dendritic cells was more efficient with mRNA containing a poly(A) tail length of 100 adenosine residues than one with 64 adenosine residues (Mockey et al., 2006). Thus, we wondered if the Poly(A) tail length of MART1 mRNA could also influence *in vivo* the



protection against B16 melanoma. Mice were immunized with lipopolyplexes containing 25µg MART1 mRNA with a poly(A) tail of 100 adenosines (ARCA-MART1-A100) or 64 adenosines (ARCA-MART1-A64). The immunization was more efficient with ARCA-MART1-A100 than with ARCA-MART1-A64 indicating that the effectiveness of the mRNA was strictly dependent on the Poly(A) tail length (Fig. 3).

### Effectiveness of mRNA versus DNA vaccine

The immunization effect of MART1 mRNA was further compared to that of a plasmid DNA (pCMV-MART1) encoding MART1 antigen. Data in Figure 3 show that no significant inhibition of tumour growth was obtained after administration of lipopolyplexes containing pCMV-MART1, indicating that mRNA transfer was more efficient than DNA transfer.

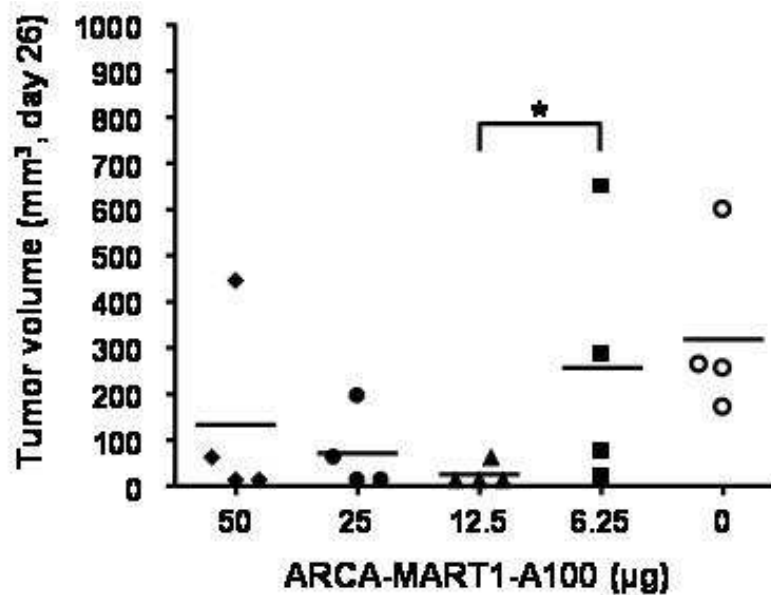


**Figure 3: Influence of mRNA Poly(A) tail length and compared efficiency of mRNA versus DNA.**

Mice were immunized on days 0 and 7 with isotonic solution (open triangle), lipopolyplexes containing 25 µg of ARCA-MART1-A100, ARCA-MART1-A64 or pCMV-MART1 as DNA vaccine. On day 14, mice were subcutaneously challenged with  $10^5$  B16/F10 cells. Tumour volumes were measured on day 26. Data of individual mice and mean of tumour volume from four mice per group are shown. Statistical analysis was performed (Student's t test) : \*  $p \leq 0.05$ .

### Optimisation of MART1 mRNA dose administration

Dose-response experiments were performed to check how the tumour protective effect was dependent on the amount of MART1 mRNA injected. Mice were injected two times with lipopolyplexes containing 6.25 µg, 12.5 µg, 25 µg or 50 µg of ARCA-MART1-A100. A significant inhibition of the tumour volume was obtained with 12.5 µg, 25 µg and 50 µg of MART1 mRNA (Fig. 4). In contrast, no protection was obtained with 6.25 µg of MART1 mRNA. Therefore, 12.5 µg ARCA-MART1-A100 mRNA seemed to give an optimal tumour protective response.



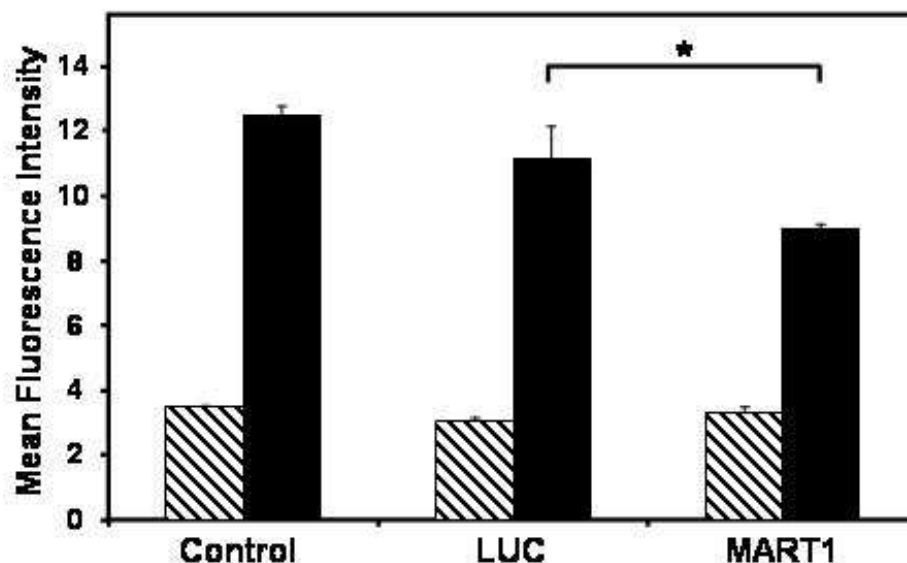
**Figure 4: MART1 mRNA dose response efficiency.**

Tumour volumes measured on day 26 after mice immunization on days 0 and 7 with variable doses of MART1 mRNA lipopolyplexes and a  $10^5$  B16/F10 cells subcutaneous challenge on day 14. Data of individual mice and mean of volume tumor of four mice groups are shown. Statistical analysis was performed (Student's t test) : \*  $p \leq 0.05$ .

### MART1 mRNA lipopolyplexes do not induce antibody response.

The presence of serological anti-B16/F10 antibodies in mice injected twice with either MART1 mRNA lipopolyplexes, LUC mRNA lipopolyplexes or isotonic solution was checked in the sera collected on day 14. Anti-B16/F10 antibodies were also tested in the sera of immunized mice collected on day 28 after the B16/F10 cells challenge. We found that B16/F10 cells were not labelled with any day 14 pre-challenged mouse sera either from control, LUC or MART1 immunized groups (Fig. 5). In contrast, B16-specific antibodies were detected on day 28 in the sera of non-immunized control mice bearing the tumour, demonstrating that a B16-specific humoral response corresponding to an IgG secretion occurred after the tumour challenge. Immunization with MART1 or LUC mRNA lipopolyplexes did not increase the level of anti-B16 antibodies detected in the sera of post-challenged mice

on day 28. The mean of the fluorescence intensity of B16/F10 cells was 12.5 ( $\pm$  0.3), 11.1 ( $\pm$  1) and 9 ( $\pm$  0.2) with sera of control, LUC and MART1 groups, respectively.



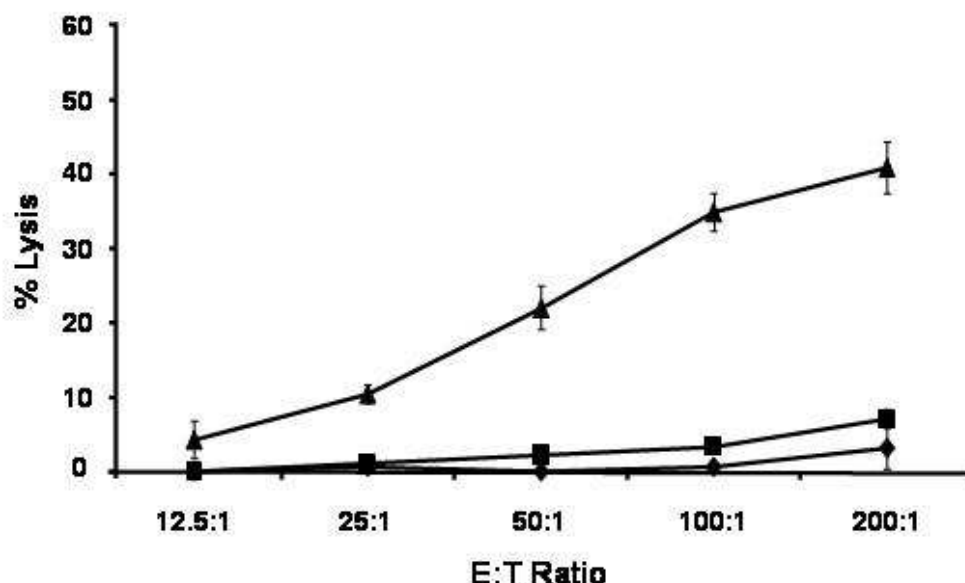
**Figure 5 : Detection of anti-B16 antibodies in mice before and after challenge with tumour cells.**

Mice were immunized on days 0 and 7 by i.v. injection of either a NaCl 0.9 % solution (Control), 25  $\mu$ g ARCA-MART1-A100 mRNA lipopolyplexes (MART1) or 25  $\mu$ g ARCA-LUC-A100 mRNA lipopolyplexes (LUC) and subcutaneously challenged on day 14 with  $10^5$  B16/F10 cells. Pre- (open bar) and Post-challenge serum (filled bar) were collected on day 14 and 28, respectively. Diluted mice sera were incubated with methanol-fixed B16/F10 cells and then with Cy5-labelled anti-mouse IgG secondary antibodies. The fluorescence intensity of cells was measured by flow cytometry. The mean fluorescence intensity values ( $\pm$  SD) of  $n = 8$  mice are shown and are from two independent experiments. Statistical analysis was performed (Student's t test) : \*  $p \leq 0.05$ .

### **MART1 mRNA lipopolyplexes induce a cellular immune response.**

To evidence that MART1 mRNA immunization induced a cellular immune response priming, a cytotoxicity assay and the measurement of IFN- $\gamma$  secretion were conducted. Seven days after the second injection of mRNA lipopolyplexes, splenocytes and afferent lymph node cells were collected and restimulated for 3 days with mitomycin-inactivated B16/F10 cells. Anti-B16 cytotoxic T lymphocytes were specifically induced by MART1 mRNA lipopolyplexes (Fig.6). No lysis was obtained with effector cells from the LUC mRNA group. The secretion of IFN- $\gamma$  by T cells further confirmed the induction of a cell-mediated response by MART1 mRNA lipopolyplexes (Table 1). After 20 h *ex vivo* re-stimulation by B16/F10 cells, no significant IFN- $\gamma$  labelling was detected in CD8 $^+$  and CD4 $^+$  cells from mice treated with LUC mRNA whereas a positive IFN- $\gamma$  staining was observed in cells isolated from mice treated with MART1 mRNA (Table 1). In the latter group, 3.5 % ( $\pm$  1.1) and 3.8 % ( $\pm$  0.9) of total LN isolated cells were CD4 $^+$  and CD8 $^+$  IFN- $\gamma$  positive cells, respectively. In spleen, these proportions were 2.3 % ( $\pm$  0.2) and 5.9 % ( $\pm$  1.2) of the total splenocytes, respectively.

Altogether, these data indicated that immunization by systemic injection of MART1-mRNA lipopolyplexes induced an anti-B16 specific cell-mediated response.



**Figure 6 : MART1 mRNA lipopolyplexes induce a cellular immune response.**

Groups of three mice were immunized on days 0 and 7 by i.v. injection of 25  $\mu$ g ARCA-MART1-A100 mRNA lipopolyplexes (filled triangle), ARCA-LUC-A100 mRNA lipopolyplexes (filled square) or isotonic solution (filled diamond). Spleen and afferent lymph node cells were isolated on day 14 and co-cultured for 3 days with mitomycin-inactivated B16/F10 cells. Then, serial dilution of stimulated effector cells (E) were incubated for 5 h in triplicate with  $5 \times 10^3$  live B16/F10 target cells (T) and the cytotoxicity of supernatant was assayed by colorimetric measurement of lactate dehydrogenase release. Data are mean values expressed in percentage of lysis from experiment carried out in triplicate.

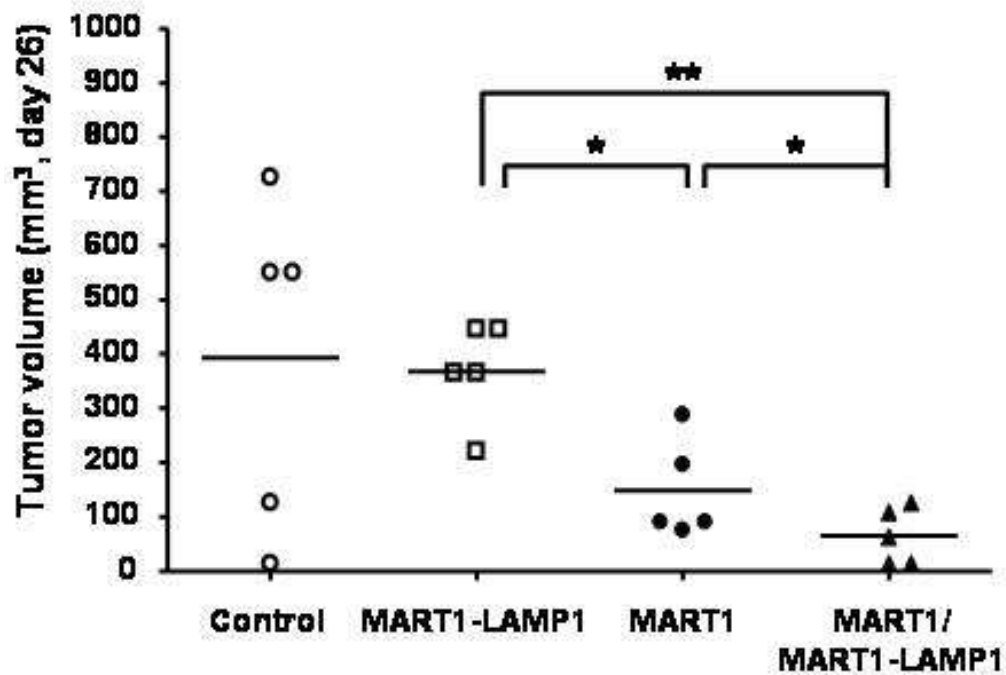
**Table I : MART1 mRNA lipopolyplexes induced the priming of B16 specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.**

Lymphocyte origin	T cell population	IFN $\gamma$ positive cells (%)	
		LUC mRNA	MART1 mRNA
LN	CD4	0.2 $\pm$ 0.05	3.5 $\pm$ 1.1
	CD8	0.1 $\pm$ 0.03	3.8 $\pm$ 0.9
Splenocytes	CD4	0.2 $\pm$ 0.08	2.3 $\pm$ 0.4
	CD8	0.3 $\pm$ 0.06	5.9 $\pm$ 1.2

Groups of three mice were immunized on days 0 and 7 by i.v. injection of 25  $\mu$ g ARCA-MART1-A100 mRNA lipopolyplexes, ARCA-LUC-A100 mRNA lipopolyplexes or isotonic solution. Spleen and afferent lymph node cells were isolated on day 14 and re-stimulated *ex vivo* by mitomycin-inactivated B16/F10 cells for 20 h incubation at 37°C. Lymphocytes CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells were assayed for IFN $\gamma$  secretion by flow cytometry.

### **Synergic effect of MHC class I and class II presentation pathways in the melanoma immune response.**

MART-1 mRNA lipopolyplexes elicited a CTL immune response indicating that MART-1 follows the MHC class I presentation pathway. Indeed, MelanA/MART1 is a type III signal-anchor protein that is mainly located to the endoplasmic reticulum and the transGolgi network [19]. We wanted to check if MART1 orientation to the MHC class II antigen presentation pathway could also induce a B16 protection. For this purpose, mice were injected with lipopolyplexes containing 12.5 µg of the ARCA-A100 mRNA version of either MART1, sig-MART1-LAMP1 corresponding to MelanA/MART1 mRNA carrying the lysosomal sorting signal from LAMP1 protein or a mixture of both (6.25 µg : 6.25 µg). On day 26, no protective effect was observed for mice treated with sig-MART1-LAMP1 compared to control mice while as described above, 12.5µg of MART1 mRNA lipopolyplexes was sufficient to get this protection (Fig.7). Surprisingly, the anti-tumour response was significantly higher with lipopolyplexes containing the mixture of MART1 mRNA and sig-MART1-Lamp1 mRNA than with MART1 mRNA lipopolyplexes. Altogether, these observations indicate that exclusive targeting of MART-1 protein to MHC class II presentation pathway was not efficient to induce a B16 melanoma growth protection. However, the immunization with MART-1 targeting both class I and class II pathways augmented significantly the tumour protection.



**Figure 7: Synergic protective effect of sig-MART1-LAMP1 mRNA lipopolyplexes.**

Mice were immunized i.v. on days 0 and 7 with lipopolyplexes containing 12.5 µg of ARCA-sig-MART1-LAMP1-A100, ARCA-MART1-A100 or a mixture of 6.25 µg of both mRNA. Injection of isotonic solution was used as control. Mice were subcutaneously challenged on day 14 with  $10^5$  B16/F10 cells. Tumour volumes were measured on day 26. Data of individual mice and mean of tumour volume of five mice per group are shown. \*  $p \leq 0.05$ .

## Discussion

Here, we report that MART-1 mRNA lipopolyplexes effectively generate an immune response and *in vivo* protection against B16 melanoma growth. The originality of this work concerns the use of specific motifs (ARCA and 100 A residues at the 5' and 3' end, respectively) of the mRNA transcript and the combination of a histidine-rich cationic polymer and a histidylated lipid for mRNA vectorization. Most of studies reporting direct mRNA transfer have been done with conventional liposomes such as cholesterol/phosphatidylcholine/phosphatidylserine [4] or DOTAP/cholesterol [6]. For our part, we have exploited the combination of polymer and lipid to form mRNA particles (termed lipopolyplexes). First, mRNA was condensed with PEGylated histidylated polylysine before adding L-histidine-(N,N-di-n-hexadecylamine)ethylamide liposomes. As we have observed by transmission electronic microscopy, the combination resulted to the polyplex entrapment by liposomes (Mockey et al., submitted). This encapsulation by cationic liposomes was possible because the polyplex charge was weakly positive consequently to the presence of PEG on the cationic polymer. The anti-tumour protection is specific because lipopolyplexes containing LUC mRNA used as irrelevant mRNA were inefficient. Lipoplex nor polyplex formulations did not induce a significant inhibition of the melanoma growth proving the positive synergic effect of the polymer and lipid combination. Both the mRNA polyplex entrapment by liposomes increasing mRNA protection against nuclease digestion and the synergic effect of the pH-sensitive histidylated polymer and liposomes mediating endosome escape of mRNA inside APC can explain the benefit of the lipopolyplex formulation over the others.

The immunization was more efficient with an IVT mRNA bearing a poly(A) tail length of 100 adenosine residues than with one carrying a tail of 64 adenosine residues. This is in agreement with our previous findings on the *in vitro* mRNA lipofection of dendritic cells and is probably due to an increase of the intracellular mRNA stability with the longer Poly(A) tail [11]. The effect of IVT mRNA immunization was much more higher than of DNA immunization. This is also consistent with the fact that MART-1 antigen expression upon DNA-transfection of APC requires the nuclear machinery and consequently the plasmid import in the nucleus. Although, the histidine-rich vectors favoured a delivery of nucleic acids in the cytosol which is enough for mRNA translation, they did not achieve an efficient nuclear delivery of the plasmid DNA.

We cannot also exclude that mRNA primary and secondary structures might have an impact on the immune system activation. Indeed, several groups have demonstrated that DC can be activated by double stranded or GU-rich sequence of mRNA *via* TLR7 and TLR8 Toll-like receptors [20, 21]. The activation seemed to occur when stretches of double stranded

mRNA were present in the 3'UTR end. Such structures are able to bind and to activate Protein Kinase R (PKR) [22]. It was reported that action of double stranded RNA stretches on PKR signalling [23] or on TLR 3 [24] could be responsible in the induced DC activation. It has also been reported that guanine nucleoside analogues, particularly with purine ring substitution at the 7-position, stimulated TLR7 [25]. TLR7/TLR8 activation could also contribute as an additional natural adjuvant generating a powerful protection when plasmacytoid DC are involved. The contribution of TLR activation for this novel vaccine strategy has to be explored using gene deficient mice.

Overall, our data indicate that an immune response involving antigen presentation *via* MHC-I occurs. Indeed, a CTL-mediated anti-B16 melanoma response was induced by MART-1 mRNA lipopolyplexes while LUC mRNA ones did not. This is in agreement with data obtained upon injection of electroporated DC with IVT tumour and viral antigen mRNA [26, 27] as well as on mice immunization with liposomes encapsulated IVT tumour antigen mRNA [4, 6]. The eliciting of a CD8 positive T cell response i.e. the orientation of the immune system towards the Th1 response allows the induction of potent protection against the melanoma growth. It has been reported that Th1-associated cytokines and CTL response play a critical role in melanoma tumour specific therapy, whereas Th2 induction may enhance tumor growth [28, 29]. No humoral response i.e. a specific antibody secretion was found. After the challenge, the absence of an increase of specific antibodies to MART1 following mRNA vaccination was also found. This could be ascribed to a weak involvement of the Th2 response consequently to the Th1 response establishment.

MelanA/MART1 is a type III signal-anchor protein that is mainly located to the endoplasmic reticulum and the transGolgi network [19]. Upon their degradation by the immunoproteasome, the antigen presentation of such endogenous proteins mainly activates CD8<sup>+</sup> T-cell population. However, it has been demonstrated that CD4<sup>+</sup> T-helper cells play a key role in the establishment of the CTL response [30-32]. There are several lines of evidence showing that the antigen targeting to the MHC class II pathway mediated a specific CD4<sup>+</sup> T-cell response. The transfection of DCs *in vitro* with mRNA sig-MelanA-LAMP1, sig-MAGE-LAMP1 and sig-CEA-LAMP1 encoding chimeric MART1, MAGE and CEA redirected via the LAMP1 lysosomal compartment targeting signal to the MHC class II pathway have promoted induction of an antigen specific CD4<sup>+</sup> T-cell response [33-35]. In mice, DNA vaccines encoding sig-E7-LAMP1-16 of the human papillomavirus 16 antigen have generated simultaneous CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses [36-38]. In clinical trial, injection of hTERT-LAMP1 mRNA transfected DCs lead to an enhancement of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells against metastatic prostate cancer [39]. We found that the injection of sig-MART1-Lamp1 mRNA lipopolyplexes did not protect mice against B16 melanoma. Surprisingly, a higher protection was obtained when MART1 mRNA was mixed with sig-



MART1-Lamp1 mRNA than with MART1 mRNA lipopolyplexes alone. This suggested that i) MHC class I presentation involved with MART1 mRNA alone was required for establishment of anti-B16 melanoma immune response, ii) MHC class II presentation with MART1-LAMP1 mRNA alone did not and iii) a simultaneous MHC class I and class II presentation of MART1 and MART1-LAMP1 can enhance it. A low transfection level in APC with a 12.5 µg mRNA dose can explain the absence of protection with sig-MART1-Lamp1 mRNA lipopolyplexes alone. Indeed, high expression of the chimeric antigen might lead to MHC class I and class II presentations while a low expression is likely to mediate only a MHC class II presentation due to the complete antigen rerouting. This might be overcome by increasing the sig-MART1-LAMP1 mRNA lipopolyplexes dose.

Data obtained from dose ranging and kinetic experiments showed that two doses of 12.5 µg of mRNA were sufficient to induce the tumour protection persisting till 26 days post-injection. Increasing the mRNA amount did not improve the effect in terms of growth delay suggesting that this mRNA formulation gave an optimal immune response. Poly I:C and DNA containing CpG motifs are widely used to improve the cancer vaccine potency via activation of TLR3 and TLR9, respectively [40, 41]. Thus, adding these nucleotide adjuvant to mRNA in lipopolyplexes will be of interest to increase the anti-B16 immune response. The effect of MART1 mRNA lipopolyplexes on reducing by 75% B16 lung metastasis invasion validates the strength of the melanoma growth protection obtained. A complete blockade of the lung metastasis invasion was however not reached suggesting that once implanted, the immune response was not able to eradicate the tumour growth. Again, the enhancement of the immune defense *via* the activation of the innate immunity by powerful adjuvant as TLR nucleotide agonists will be of further help.

Although the cells that took up mRNA lipopolyplexes were not identified, the induction of an immune response suggests that specific populations of cells have been reached. The tracking of such particles in mice is not well documented. For example, that of lipoplexes made of fluorescent cationic liposomes complexed with poly I:C or CpG oligonucleotides has been reported recently [42]. Shortly upon intra peritoneal injection, lipoplexes were very rapidly taken up in draining lymph node. Lipoplexes have been located only into mediastinal lymph node but not in spleen nor other lymph nodes and phenotype studies revealed that macrophages, neutrophils and monocytes but not classical DC were stained. It is clear that different cell types can be involved for the induction of the immune response. Our vaccine approach with MART1 mRNA differs not only on the injection route (i.v.) and the nucleic acid type but also on the particle type (lipopolyplexes). When i.v. injected, lipid-protamine-DNA complexes are distributed to all major organs including spleen [43]. It is worth to note that DNA/PEG-HpK/HDHE:chol complexes containing radiolabelled DNA or liposomes were distributed inside the liver and the spleen upon i.v. injection in mice (unpublished data). Thus,

MART1 mRNA lipopolyplexes are supposed to be captured by hepatic and splenic APC including macrophages and dendritic cells. However, other circulating immune cells such as plasmacytoid DC or monocytes could be also reached. Lipofection can activate DCs as demonstrated by the up regulation of activation markers including CD80, CD86, MHC class I and MHC class II ([44, 45] and our unpublished data) and the production of cytokines as TNF- $\alpha$  and type I IFN. Such effects might occur in vivo and contribute to the activation and differentiation of APC leading to the powerful induction of immune response by MART1 mRNA lipopolyplexes.

In conclusion, two major findings emerge from this work: i) MART-1 mRNA lipopolyplexes made with a PEGylated histidine-rich polylysine and histidylated liposomes are potent vaccine against B16 melanoma growth by eliciting a cellular immune response and ii) the additional expression of MART-1 targeted to MHC class II presentation pathway increases the immune protection. The specific features of the mRNA-lipopolyplex formulation and most importantly the findings that successful anti-B16 immunization was realized only with mRNA lipopolyplexes make these novel class of lipopolyplexes important next generation non-viral vectors for future use in mRNA-based tumor vaccination. Experiments conducted to enhance the immune protection by activation of innate immunity through physically association of TLR nucleotide agonists with MART1 mRNA lipopolyplexes are currently in progress.

### **Acknowledgements**

We are grateful to A Bonehill, K. Thielemans and Van den Eynde for the kind gift of the pGEM4Z-MART1-A64 and pCMVMART1 plasmids. We thank warmly I. Mercier-Maillet<sup>2</sup> and L. Janot<sup>2</sup> for the excellent technical assistance and advice. This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer and Canceropole Grand Ouest. M.M was a recipient of a fellowship from Ministère de la recherche.

## References

1. Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA (2005) DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 175:633-639
2. Gilboa E (2004) The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 4:401-411
3. Gilboa E, Vieweg J (2004) Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 199:251-263
4. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet JG, Levy JP, Meulien P (1993) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 23:1719-1722
5. Zhou WZ, Hoon DS, Huang SK, Fujii S, Hashimoto K, Morishita R, Kaneda Y (1999) RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther* 10:2719-2724
6. Hess PR, Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E (2006) Vaccination with mRNAs encoding tumor-associated antigens and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor efficiently primes CTL responses, but is insufficient to overcome tolerance to a model tumor/self antigen. *Cancer Immunol Immunother* 55:672-683
7. Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G (2000) In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* 30:1-7
8. Pichon C, Goncalves C, Midoux P (2001) Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 53:75-94
9. Kumar VV, Pichon C, Refregiers M, Guerin B, Midoux P, Chaudhuri A (2003) Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. *Gene Ther* 10:1206-1215
10. Singh RS, Goncalves C, Sandrin P, Pichon C, Midoux P, Chaudhuri A (2004) On the gene delivery efficacies of pH-sensitive cationic lipids via endosomal protonation: a chemical biology investigation. *Chem Biol* 11:713-723
11. Mockey M, Goncalves C, Dupuy FP, Lemoine FM, Pichon C, Midoux P (2006) mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun* 340:1062-1068
12. Zhai Y, Yang JC, Spiess P, Nishimura MI, Overwijk WW, Roberts B, Restifo NP, Rosenberg SA (1997) Cloning and characterization of the genes encoding the murine homologues of the human melanoma antigens MART1 and gp100. *J Immunother* 20:15-25
13. Ribas A, Butterfield LH, Hu B, Dissette VB, Chen AY, Koh A, Amarnani SN, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS (2000) Generation of T-cell immunity to a murine melanoma using MART-1-engineered dendritic cells. *J Immunother* 23:59-66
14. Ribas A, Butterfield LH, McBride WH, Jilani SM, Bui LA, Vollmer CM, Lau R, Dissette VB, Hu B, Chen AY, et al. (1997) Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res* 57:2865-2869
15. Broder H, Anderson A, Kremen TJ, Odesa SK, Liao LM (2003) MART-1 adenovirus-transduced dendritic cell immunization in a murine model of metastatic central nervous system tumor. *J Neurooncol* 64:21-30
16. Fukuda M, Viitala J, Matteson J, Carlsson SR (1988) Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. *J Biol Chem* 263:18920-18928
17. Granger BL, Green SA, Gabel CA, Howe CL, Mellman I, Helenius A (1990) Characterization and cloning of Igpl10, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* 265:12036-12043
18. Midoux P, Monsigny M (1999) Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem* 10:406-411
19. Rimoldi D, Muehlethaler K, Salvi S, Valmori D, Romero P, Cerottini JC, Levy F (2001) Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J Biol Chem* 276:43189-43196
20. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531
21. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529

22. Nussbaum JM, Gunnery S, Mathews MB (2002) The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic Acids Res* 30:1205-1212
23. Ceppi M, Ruggli N, Tache V, Gerber H, McCullough KC, Summerfield A (2005) Double-stranded secondary structures on mRNA induce type I interferon (IFN alpha/beta) production and maturation of mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells. *J Gene Med* 7:452-465
24. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279:12542-12550
25. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6646-6651
26. Kavanagh DG, Kaufmann DE, Sunderji S, Frahm N, Le Gall S, Boczkowski D, Rosenberg ES, Stone DR, Johnston MN, Wagner BS, et al. (2006) Expansion of HIV-specific CD4+ and CD8+ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood* 107:1963-1969
27. Milazzo C, Reichardt VL, Muller MR, Grunebach F, Brossart P (2003) Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood* 101:977-982
28. Marshall JA, Forster TH, Purdie DM, Lanagan CM, O'Connor LE, O'Rourke MG, Johnson MK, See JL, Ellem KA, Martinez NR, et al. (2006) Immunological characteristics correlating with clinical response to immunotherapy in patients with advanced metastatic melanoma. *Immunol Cell Biol* 84:295-302
29. Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F (1998) A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *J Immunol* 160:5869-5873
30. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR (1997) Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186:65-70
31. Fayolle C, Deriaud E, Leclerc C (1991) In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *J Immunol* 147:4069-4073
32. Serre K, Giraudo L, Siret C, Leserman L, Machy P (2006) CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo. *Eur J Immunol* 36:1386-1397
33. Bonehill A, Heirman C, Thielemans K (2005) Genetic approaches for the induction of a CD4+ T cell response in cancer immunotherapy. *J Gene Med* 7:686-695
34. Bonehill A, Heirman C, Tuyaerts S, Michiels A, Breckpot K, Brasseur F, Zhang Y, Van Der Bruggen P, Thielemans K (2004) Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol* 172:6649-6657
35. Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lysterly HK, Gilboa E (1998) Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16:364-369
36. Ji H, Wang TL, Chen CH, Pai SI, Hung CF, Lin KY, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC (1999) Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther* 10:2727-2740
37. Kim MS, Sin JI (2005) Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model. *Immunology* 116:255-266
38. Kim TG, Kim CH, Won EH, Bae SM, Ahn WS, Park JB, Sin JI (2004) CpG-ODN-stimulated dendritic cells act as a potent adjuvant for E7 protein delivery to induce antigen-specific antitumour immunity in a HPV 16 E7-associated animal tumour model. *Immunology* 112:117-125
39. Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, et al. (2005) Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 174:3798-3807
40. Adams M, Navabi H, Croston D, Coleman S, Tabi Z, Clayton A, Jasani B, Mason MD (2005) The rationale for combined chemo/immunotherapy using a Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist and tumour-derived exosomes in advanced ovarian cancer. *Vaccine* 23:2374-2378
41. Mason KA, Ariga H, Neal R, Valdecanas D, Hunter N, Krieg AM, Whisnant JK, Milas L (2005) Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin Cancer Res* 11:361-369.

42. Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, Dow S (2006) Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* 176:7335-7345
43. Dileo J, Banerjee R, Whitmore M, Nayak JV, Falo LD, Jr., Huang L (2003) Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery to antigen-presenting cells results in enhanced anti-tumor immune responses. *Mol Ther* 7:640-648
44. Ni H, Capodici J, Cannon G, Communi D, Boeynaems JM, Kariko K, Weissman D (2002) Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion and signaling through a nucleotide receptor. *J Biol Chem* 277:12689-12696
45. Waeckerle-Men Y, Scandella E, Uetz-Von Allmen E, Ludewig B, Gillesen S, Merkle HP, Gander B, Groettrup M (2004) Phenotype and functional analysis of human monocyte-derived dendritic cells loaded with biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres for immunotherapy. *J Immunol Methods* 287:109-124

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux confirment que l'ARNm d'un antigène tumoral est une forme de l'antigène intéressante pour une vaccination antitumorale. Ils montrent que des vecteurs histidylés participent efficacement à son transfert dans les cellules immunocompétentes, tant *ex vivo* avec les polyplexes dans les cellules dendritiques humaines matures, qu'*in vivo* lors de l'injection systémique des lipopolyplexes histidylés. Ces résultats appellent quelques commentaires et offrent de nombreuses perspectives sur le plan fondamental et appliqué.

### I. Stratégie *ex vivo*

Les premiers résultats présentés démontrent que le transfert dans les cellules dendritiques murines et humaines d'un ARNm de type ARCA-A100, optimisé en 5' et 3' pour sa stabilité et sa traduction, permet une expression protéique plus importante que celle obtenue par transfert d'un ARNm synthétisé de façon classique. L'étude de transfection des DCs humaines par les vecteurs histidylés rapportent que le polymère PEI-HIS est particulièrement adapté au transfert de l'ARNm d'un antigène tumoral dans les hDCs matures. Cette efficacité semble être liée au fait que les complexes ARNm/PEI-His transitent dans les hDCs matures par des vésicules acides, qui confère au polymère des propriétés fusiogènes vis-à-vis les membranes cellulaires. Le processus d'internalisation dans les hDCs au stade immature ne semble pas suivre cette voie empruntant des vésicules acides. Un facteur limitant le rendement de transfection est donc le taux de maturation des hDCs au cours de leur préparation. Or, une maturation insuffisante est également incompatible avec une réinjection des DCs chez le patient. En effet, une maturation correcte des cellules est nécessaire à l'expression des molécules du CMH et de costimulation indispensables à une présentation antigénique efficace. Mais elle est également nécessaire à l'expression de certains récepteurs aux chimiokines (ex : CCR7) qui permettent leur migration et la colonisation des ganglions lymphatiques. Il est donc souhaitable d'augmenter le rendement de maturation des hDCs avant l'étape de transfection avec l'ARNm de l'antigène tumoral. Pour cela nous pourrions ajouter au cocktail de cytokines (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ ) déjà utilisé l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  ou le CD40 ligand soluble comme proposé par Kalady et coll. (Kalady, Onaitis et coll. 2004).

Une étude plus approfondie de l'internalisation des polyplexes PEI-HIS/ARNm dans les hDCs pourra déterminer leur trafic intracellulaire et comprendre pourquoi le transfert de l'ARNm dans les hDCs immatures avec le polymère PEI-HIS est inefficace. Pour cela, un ARNm et un polymère marqués par deux fluorochromes différents pourront être utilisés, afin

de suivre par microscopie confocale le devenir des complexes mais également celui de chaque partenaire. Des molécules agissant spécifiquement sur les processus d'internalisation pourront également être utilisées : la cytochalasine D (rupture des microfilaments d'actine), le nocodazole (dépolarisation des microtubules), la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, la filipine (action sur le cholestérol, inhibition des cavéoles) et la chlorpromazine (inhibition des voies clathrine-dépendantes). Des marqueurs des différents compartiments cellulaires permettront de préciser le routage des molécules d'intérêt : l'AP-2 (vésicules à clathrine), le EEA1 (endosomes précoces), le Rab-11 (vésicules de recyclage), le couple Rab-7/ Rab-9 (endosomes tardifs) et le couple CMH-II/LAMP-1 (vésicules de classe II). Ces travaux pourront orienter le développement de nouveaux vecteurs histidylés ou de nouvelles formulations afin d'obtenir une délivrance efficace de l'ARNm dans les hDCs immatures.

Une analyse de l'influence de l'origine de hDCs sur l'efficacité de transfection pourra également être réalisée. En effet, certaines différences ont été rapportées lors de l'utilisation des DCs dérivés de monocytes sanguins (Mo-DCs) et celles dérivées de précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (BMDC). Ainsi, le transfert d'ARNm par électroporation semble légèrement plus efficace dans les Mo-DCs que dans les DCs dérivées de BMDCs (Lundqvist, Noffz et coll. 2002).

Une évaluation de l'effet vaccinal ou thérapeutique de la réinjection de DCs transfectées avec un ARNm d'antigène tumoral pourra être effectuée chez la souris en utilisant la lignée murine de cellules dendritiques JAWSII. En effet, ces cellules sont de souche C57BL/6, ce qui permet un transfert syngénique dans les souris utilisées pour le modèle B16. De plus, nous avons montré dans le premier manuscrit que la transfection des cellules JAWSII par l'ARNm ARCA-MART1-A100 conduit à une forte expression de la protéine antigénique. Enfin, il a été rapporté que ces cellules chargées en antigène permettent d'induire *in vivo* une réponse de type Th1 avec une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Chamarthy, Kovacs et coll. 2003). Il sera donc possible par transfert adoptif d'évaluer *in vivo* l'efficacité de la présentation antigénique des cellules JAWSII transfectées *in vitro* et d'analyser une éventuelle réponse antitumorale. Des expériences préliminaires en utilisant les polyplexes PEI-HIS/ARCA-MART1-A100 ont donné des résultats encourageants.

## **II. Stratégie *in vivo***

En ce qui concerne l'utilisation de l'ARNm d'antigène tumoral directement *in vivo*, nous avons montré que l'injection intraveineuse de lipopolyplexes histidylés contenant l'ARNm ARCA-MART1-A100 permet d'obtenir une protection, spécifique et significative,



contre la progression du mélanome B16F10. Ces lipopolyplexes histidylés correspondent à une nouvelle formulation à trois partenaires PEG-HpK/ARNm/HDHE :Cho qui structurellement sont des polyplexes PEG-HpK/ARNm encapsulés dans des liposomes HDHE :Cho. Il a précédemment été démontré que la fixation d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) de masse molaire de 5 kDa par molécule de HpK empêche la formation d'agrégats dans les conditions physiologiques en sels (Pichon, Goncalves et coll. 2001). Les résultats obtenus avec de l'ADN plasmidique ont montré que les lipopolyplexes ADN/PEG-HpK/HDHE:chol passent la barrière pulmonaire pour se concentrer dans le foie et la rate où ils peuvent être capturés par des APC (résultats non publiés). En ce qui concernant les particules PEG-HpK/ARNm/HDHE :Cho leur biodistribution dans l'organisme et le type de cellules transfectées à l'origine de cette réponse antitumorale restent à déterminer.

Pour cela, en utilisant des lipopolyplexes contenant l'ARNm ARCA-LUC-A100 codant la luciférase, nous pourrions déterminer la localisation des cellules transfectées et établir une cinétique d'expression de l'ARNm. Deux approches sont envisageables. La première consiste à sacrifier les souris traitées, prélever, isoler et broyer les différents organes pour détecter l'expression de la luciférase par son activité lumineuse dans le lysat de chacun d'eux. Bien que très sensible, cette technique devient vite contraignante pour une analyse cinétique de l'expression de l'ARNm. La seconde approche, non invasive mais moins sensible, serait plus adaptée aux études cinétiques. Après injection de luciférine dans les souris traitées, l'activité de la luciférase exprimée dans les cellules transfectées et conduisant à l'émission de photons lumineux peut être détectée par une caméra ultrasensible. Cependant, cette technique ne peut pas être effectuée avec des souris C57BL/6, les photons étant fortement absorbés par leur pelage noir. Elle pourra se faire sur des souris blanches telles que les BALB/c.

Une approche histochimique pourra également être réalisée sur les organes lymphoïdes des souris C57BL/6 vaccinées. A l'aide d'ARNm marqué par un fluorophore, il sera possible de localiser *in situ* les cellules transfectées ayant internalisé l'ARNm après injection. La récupération des cellules permettra d'effectuer un phénotypage afin de déterminer à quel type cellulaire elles appartiennent. Ainsi Dileo et coll. ont montré que les acides nucléiques vectorisés sous forme de LPD (Lipide-Protamine-ADN) s'accumulent au niveau de la zone marginale de la rate dans des cellules présentatrices d'antigènes (DCs, macrophages) (Dileo, Banerjee et coll. 2003). Enfin avec l'utilisation d'un ARNm codant pour un antigène tel que MART1, une approche immunohistochimique avec l'utilisation d'un anticorps anti-MART1 permettra de localiser les cellules exprimant l'antigène dans les organes isolés. On s'intéressera alors non pas la distribution de l'ARNm mais l'expression de la protéine codée par cet ARNm.

Le protocole de vaccination contre le mélanome B16 utilisé au cours de mes travaux est basé sur deux injections intraveineuses à 7 jours d'intervalle des lipopolyplexes contenant l'ARNm ARCA-MART1-A100 et l'inoculation des cellules tumorales au 14<sup>ème</sup> jour. Dans ces conditions, un effet protecteur est observable aussi bien dans le modèle de tumeur cutanée que de métastases pulmonaires du mélanome. Cependant, une protection totale n'est pas obtenue. Il sera intéressant de tester l'effet d'une troisième injection ou des temps d'intervalle plus long, afin de voir si une augmentation de la protection antitumorale est obtenue. Différentes voies d'injection des lipopolyplexes pourront également être comparées, notamment en intradermique (i.d.), en sous-cutanée (s.c.) mais aussi intrapéritonéale (i.p.) ou intramusculaire (i.m.). Enfin, une protection dans un contexte thérapeutique après mise en place de la tumeur sera recherchée.

Au niveau des mécanismes de la réponse immune, les résultats obtenus ne montrent pas la mise en place d'une réponse humorale. Seule une réponse cellulaire anti-B16F10 de type Th1 a été mise en évidence. Afin de confirmer ces résultats et déterminer les différents types cellulaires (lymphocytes T, B et cellules NK) impliqués dans la réponse antitumorale rapportée, l'effet vaccinal sera évalué avec des souris transgéniques déficientes pour les gènes RAG et  $\gamma c$ . Les gènes RAG codent pour les recombinaisons indispensables aux réarrangements des gènes d'immunoglobuline et du TCR. L'absence de ces réarrangements bloque totalement la différenciation lymphocytaire T et B, et induit un déficit immunitaire sévère. Les expériences sur ces souris démontreront donc le rôle des lymphocytes dans l'effet protecteur observé. Le gène  $\gamma c$  code la chaîne protéique gamma-c commune aux récepteurs des interleukines 2, 4, 7, 9 et 15. Combiné à une déficience des gènes RAG, cette mutation empêche le développement des lymphocytes T, B et des cellules NK. Les expériences de vaccination sur des souris doublement invalidées permettront donc de déterminer l'implication de ces 3 types cellulaires dans la réponse antitumorale. La comparaison des résultats obtenus entre les simples et les doubles invalidations révélera la part propre aux cellules NK. Nous pourrons également évaluer la mise en place d'une mémoire immunitaire par transfert de splénocytes de souris vaccinées dans des souris non vaccinées. Après ce transfert adoptif, des cellules tumorales B16F10 seront inoculées dans les souris receveuses et la réponse antitumorale sera évaluée. Enfin, pour préciser les mécanismes immunitaires induits lors de la vaccination par injection des lipopolyplexes contenant l'ARNm MART1, il sera intéressant d'effectuer une étude des clones lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> réactifs par marquage à l'aide d'un tétramère MART-1. Cette technique consiste en un marquage direct du TCR avec un complexe de quatre unités de CMH de classe-I préalablement chargées de l'épitope d'intérêt. La fixation de ce tétramère couplé à un fluorochrome est ensuite évaluée par cytométrie en flux. Nous pourrons ainsi

déterminer si ces CD8<sup>+</sup> réactifs sont dirigés ou non contre l'épitope majoritairement présenté chez la souris de la protéine antigénique MART-1 (peptide EAAGIGILIV, position 26-37).

Pour améliorer la réponse antitumorale obtenue, nous pourrions envisager de stimuler la réponse immunitaire innée en utilisant des agonistes des récepteurs Toll-like (TLRs)(Becker 2006). Parmi ces agonistes certains sont de nature nucléique et pourront donc être incorporés dans la formulation des lipopolyplexes. Ainsi, des oligonucléotides synthétiques à motifs CpG se liant et activant le TLR9 ont déjà été utilisés comme adjuvants dans les traitements par radiothérapie du mélanome (Mason, Ariga et coll. 2005) ou de lymphomes non-Hodgkiniens (Paul 2003). Des ARN double-brin synthétiques tels que les Poly I :C sont agonistes du TLR3 et actuellement utilisés dans la maturation des DCs. Leur utilisation en complément d'un traitement par chimiothérapie des cancers ovariens s'est montrée très bénéfique (Adams, Navabi et coll. 2005). Leur rôle dans la réponse immune obtenue pourra être envisagé en utilisant des souris C57BL/6 déficientes pour un ou plusieurs de ces récepteurs, voire pour la protéine adaptatrice MyD88 médiant leur signal.

Nous avons obtenu un effet vaccinal antitumoral par transfert de l'ARNm d'un seul antigène. Les ARNm de plusieurs antigènes tumoraux pourront être utilisés afin de limiter le risque d'échappement des cellules tumorales. Dans le modèle du mélanome, des expériences ont rapporté des résultats intéressants avec d'autres antigènes, tels que la gp100 (Zhou, Hoon et coll. 1999), la tyrosinase (Alijagic, Moller et coll. 1995) ou encore MAGE-3 (Marchand, van Baren et coll. 1999). L'ARNm codant pour ces antigènes tumoraux pourra être ajouté à celui de MART1 ou injectés séparément dans les lipopolyplexes.

Enfin, la formulation contenant l'ARNm pourra être améliorée. De nouveaux vecteurs pourront être élaborés sur la base des lipopolyplexes histidylés afin d'améliorer l'efficacité du transfert de l'ARNm d'antigène tumoral *in vivo* et de la réponse antitumorale. Ainsi, nous pouvons envisager de greffer des ligands spécifiques sur les liposomes HDHE :Cho, comme du mannose ou des chaînes d'oligomannose, qui permettront de cibler les cellules présentatrices d'antigènes (Kawakami, Sato et coll. 2000; Hattori, Kawakami et coll. 2006). Un polymère réductible permettant une délivrance plus facile de l'ARNm dans le cytosol pourra aussi être utilisé (Pichon, LeCam et coll. 2002).

## **BIBLIOGRAPHIE**

# BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Wahab, Z., Kalady, M. F., Emani, S., Onaitis, M. W., Abdel-Wahab, O. I., Cisco, R., Wheless, L., Cheng, T. Y., Tyler, D. S. et Pruitt, S. K. (2003). "Induction of anti-melanoma CTL response using DC transfected with mutated mRNA encoding full-length Melan-A/MART-1 antigen with an A27L amino acid substitution." *Cell Immunol* **224**(2): 86-97.
- Absher, M. et Stinebring, W. R. (1969). "Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator." *Nature* **223**(207): 715-7.
- Ackerman, A. L. et Cresswell, P. (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." *Nat Immunol* **5**(7): 678-84.
- Adams, M., Navabi, H., Croston, D., Coleman, S., Tabi, Z., Clayton, A., Jasani, B. et Mason, M. D. (2005). "The rationale for combined chemo/immunotherapy using a Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist and tumour-derived exosomes in advanced ovarian cancer." *Vaccine* **23**(17-18): 2374-8.
- Akira, S. et Takeda, K. (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **4**(7): 499-511.
- Albert, M. L., Darnell, J. C., Bender, A., Francisco, L. M., Bhardwaj, N. et Darnell, R. B. (1998). "Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration." *Nat Med* **4**(11): 1321-4.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. et Bhardwaj, N. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Alijagic, S., Moller, P., Artuc, M., Jurgovsky, K., Czarnetzki, B. M. et Schadendorf, D. (1995). "Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation." *Eur J Immunol* **25**(11): 3100-7.
- Andersen, M. H., Keikavoussi, P., Brocker, E. B., Schuler-Thurner, B., Jonassen, M., Sondergaard, I., Straten, P. T., Becker, J. C. et Kampgen, E. (2001). "Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression." *Int J Cancer* **94**(6): 820-4.
- Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S., Mazzocchi, A., Squarcina, P., Herlyn, M. et Parmiani, G. (1993). "Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients." *J Exp Med* **177**(4): 989-98.
- Anjuere, F., Martin, P., Ferrero, I., Fraga, M. L., del Hoyo, G. M., Wright, N. et Ardavin, C. (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse." *Blood* **93**(2): 590-8.
- Aoki, Y., Hosaka, S., Kawa, S. et Kiyosawa, K. (2001). "Potential tumor-targeting peptide vector of histidylated oligolysine conjugated to a tumor-homing RGD motif." *Cancer Gene Ther* **8**(10): 783-7.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L. et Shortman, K. (1993). "Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population." *Nature* **362**(6422): 761-3.
- Ayyoub, M., Migliaccio, M., Guillaume, P., Lienard, D., Cerottini, J. C., Romero, P., Levy, F., Speiser, D. E. et Valmori, D. (2001). "Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing." *Eur J Immunol* **31**(9): 2642-51.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. et Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H. et Lipford, G. B. (2001). "Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells." *J Immunol* **166**(8): 5000-7.
- Becker, Y. (2006). "Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers--a review, hypothesis and implications." *Anticancer Res* **26**(2A): 1113-34.
- Bedrosian, I., Mick, R., Xu, S., Nisenbaum, H., Faries, M., Zhang, P., Cohen, P. A., Koski, G. et Czerniecki, B. J. (2003). "Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients." *J Clin Oncol* **21**(20): 3826-35.
- Behr, J. P., Demeneix, B., Loeffler, J. P. et Perez-Mutul, J. (1989). "Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 6982-6.

- Bello-Fernandez, C., Matyash, M., Strobl, H., Pickl, W. F., Majdic, O., Lyman, S. D. et Knapp, W. (1997). "Efficient retrovirus-mediated gene transfer of dendritic cells generated from CD34+ cord blood cells under serum-free conditions." Hum Gene Ther **8**(14): 1651-8.
- Bello Roufai, M. et Midoux, P. (2001). "Histidylated polylysine as DNA vector: elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes." Bioconjug Chem **12**(1): 92-9.
- Benns, J. M., Choi, J. S., Mahato, R. I., Park, J. S. et Kim, S. W. (2000). "pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer." Bioconjug Chem **11**(5): 637-45.
- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. et Liu, Y. J. (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Nam, J. H., Lyster, H. K. et Gilboa, E. (2000). "Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells." Cancer Res **60**(4): 1028-34.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. et Gilboa, E. (1996). "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." J Exp Med **184**(2): 465-72.
- Boeck, R., Tarun, S., Jr., Rieger, M., Deardorff, J. A., Muller-Auer, S. et Sachs, A. B. (1996). "The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity." J Biol Chem **271**(1): 432-8.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M. L., Brasseur, R., Renauld, J. C., Coulie, P., Boon, T. et van der Bruggen, P. (1995). "BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes." Immunity **2**(2): 167-75.
- Bonehill, A., Heirman, C., Tuyaerts, S., Michiels, A., Breckpot, K., Brasseur, F., Zhang, Y., Van Der Bruggen, P. et Thielemans, K. (2004). "Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules." J Immunol **172**(11): 6649-57.
- Bonnerot, C., Boeck, R. et Lapeyre, B. (2000). "The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p." Mol Cell Biol **20**(16): 5939-46.
- Bos, G. W., Kanellos, T., Crommelin, D. J., Hennink, W. E. et Howard, C. R. (2004). "Cationic polymers that enhance the performance of HbsAg DNA in vivo." Vaccine **23**(4): 460-9.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. et Behr, J. P. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.
- Boyle, C. M. et Robinson, H. L. (2000). "Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations." DNA Cell Biol **19**(3): 157-65.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. et Maliszewski, C. R. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.
- Bright, R. K., Beames, B., Shearer, M. H. et Kennedy, R. C. (1996). "Protection against a lethal challenge with SV40-transformed cells by the direct injection of DNA-encoding SV40 large tumor antigen." Cancer Res **56**(5): 1126-30.
- Britten, C. M., Meyer, R. G., Graf, C., Huber, C. et Wolfel, T. (2005). "Identification of T cell epitopes by the use of rapidly generated mRNA fragments." J Immunol Methods **299**(1-2): 165-75.
- Brodsky, I., Strayer, D. R., Krueger, L. J. et Carter, W. A. (1985). "Clinical studies with ampligen (mismatched double-stranded RNA)." J Biol Response Mod **4**(6): 669-75.
- Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L. et Brugger, W. (2000). "Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells." Blood **96**(9): 3102-8.
- Brown, C. E. et Sachs, A. B. (1998). "Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation." Mol Cell Biol **18**(11): 6548-59.
- Brown, C. E., Tarun, S. Z., Jr., Boeck, R. et Sachs, A. B. (1996). "PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **16**(10): 5744-53.
- Brown, M. D., Schatzlein, A. G. et Uchegbu, I. F. (2001). "Gene delivery with synthetic (non viral) carriers." Int J Pharm **229**(1-2): 1-21.
- Bryant, P. W., Lennon-Dumenil, A. M., Fiebigler, E., Lagaudriere-Gesbert, C. et Ploegh, H. L. (2002). "Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules." Adv Immunol **80**: 71-114.
- Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J. E., Bortzov, F. et Wolff, J. A. (1996). "pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector." Nat Biotechnol **14**(6): 760-4.

- Burch, P. A., Breen, J. K., Buckner, J. C., Gastineau, D. A., Kaur, J. A., Laus, R. L., Padley, D. J., Peshwa, M. V., Pitot, H. C., Richardson, R. L., Smits, B. J., Sopapan, P., Strang, G., Valone, F. H. et Vuk-Pavlovic, S. (2000). "Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer." *Clin Cancer Res* **6**(6): 2175-82.
- Cantrell, D. (1996). "T cell antigen receptor signal transduction pathways." *Annu Rev Immunol* **14**: 259-74.
- Carter, W. A., Hubbell, H. R., Krueger, L. J. et Strayer, D. R. (1985). "Comparative studies of ampligen (mismatched double-stranded RNA) and interferons." *J Biol Response Mod* **4**(6): 613-20.
- Carter, W. A., Strayer, D. R., Hubbell, H. R. et Brodsky, I. (1985). "Preclinical studies with Ampligen (mismatched double-stranded RNA)." *J Biol Response Mod* **4**(5): 495-502.
- Caruso, D. A., Orme, L. M., Amor, G. M., Neale, A. M., Radcliff, F. J., Downie, P., Tang, M. L. et Ashley, D. M. (2005). "Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma." *Cancer* **103**(6): 1280-91.
- Caruso, D. A., Orme, L. M., Neale, A. M., Radcliff, F. J., Amor, G. M., Maixner, W., Downie, P., Hassall, T. E., Tang, M. L. et Ashley, D. M. (2004). "Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer." *Neuro-oncol* **6**(3): 236-46.
- Castelli, C., Storkus, W. J., Maeurer, M. J., Martin, D. M., Huang, E. C., Pramanik, B. N., Nagabhushan, T. L., Parmiani, G. et Lotze, M. T. (1995). "Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **181**(1): 363-8.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. et Banchereau, J. (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." *Nature* **360**(6401): 258-61.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A. et Banchereau, J. (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." *Blood* **90**(4): 1458-70.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., Vaure, C., Chemin, K., Dieu-Nosjean, A. M. C. et Vicari, A. (2002). "Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines." *Transplantation* **73**(1 Suppl): S7-11.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. et Banchereau, J. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." *J Exp Med* **184**(2): 695-706.
- Celluzzi, C. M., Mayordomo, J. I., Storkus, W. J., Lotze, M. T. et Falot, L. D., Jr. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity." *J Exp Med* **183**(1): 283-7.
- Ceppi, M., de Bruin, M. G., Seuberlich, T., Balmelli, C., Pascolo, S., Ruggli, N., Wienhold, D., Tratschin, J. D., McCullough, K. C. et Summerfield, A. (2005). "Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells." *J Gen Virol* **86**(Pt 9): 2525-34.
- Cerwenka, A., Baron, J. L. et Lanier, L. L. (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11521-6.
- Chakraborty, N. G., Sporn, J. R., Tortora, A. F., Kurtzman, S. H., Yamase, H., Ergin, M. T. et Mukherji, B. (1998). "Immunization with a tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting-cell-based vaccine in melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **47**(1): 58-64.
- Chamarthy, S. P., Kovacs, J. R., McClelland, E., Gattens, D. et Meng, W. S. (2003). "A cationic peptide consists of ornithine and histidine repeats augments gene transfer in dendritic cells." *Mol Immunol* **40**(8): 483-90.
- Chang, A. E., Redman, B. G., Whitfield, J. R., Nickoloff, B. J., Braun, T. M., Lee, P. P., Geiger, J. D. et Mule, J. J. (2002). "A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer." *Clin Cancer Res* **8**(4): 1021-32.
- Chaput, N., Taieb, J., Andre, F. et Zitvogel, L. (2005). "The potential of exosomes in immunotherapy." *Expert Opin Biol Ther* **5**(6): 737-47.
- Chen, C. Y. et Shyu, A. B. (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." *Trends Biochem Sci* **20**(11): 465-70.

- Chen, Q. R., Zhang, L., Luther, P. W. et Mixson, A. J. (2002). "Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles." Nucleic Acids Res **30**(6): 1338-45.
- Chen, Q. R., Zhang, L., Stass, S. A. et Mixson, A. J. (2000). "Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes." Gene Ther **7**(19): 1698-705.
- Chen, Q. R., Zhang, L., Stass, S. A. et Mixson, A. J. (2001). "Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids." Nucleic Acids Res **29**(6): 1334-40.
- Christinck, E. R., Luscher, M. A., Barber, B. H. et Williams, D. B. (1991). "Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis." Nature **352**(6330): 67-70.
- Ciubotariu, R., Colovai, A. I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R. et Suciu-Foca, N. (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells." J Immunol **161**(10): 5193-202.
- Clamme, J. P., Azoulay, J. et Mely, Y. (2003). "Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy." Biophys J **84**(3): 1960-8.
- Coleman, J., Green, P. J. et Inouye, M. (1984). "The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes." Cell **37**(2): 429-36.
- Conry, R. M., LoBuglio, A. F., Loechel, F., Moore, S. E., Sumerel, L. A., Barlow, D. L. et Curiel, D. T. (1995). "A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has in vivo antitumor activity." Gene Ther **2**(1): 59-65.
- Conry, R. M., LoBuglio, A. F., Wright, M., Sumerel, L., Pike, M. J., Johanning, F., Benjamin, R., Lu, D. et Curiel, D. T. (1995). "Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector." Cancer Res **55**(7): 1397-400.
- Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J. et Tsang, K. Y. (1997). "In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen." J Natl Cancer Inst **89**(4): 293-300.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M. et Taniguchi, M. (1997). "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors." Science **278**(5343): 1623-6.
- Cui, Z. et Mumper, R. J. (2001). "Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization." J Control Release **75**(3): 409-19.
- Cui, Z. et Mumper, R. J. (2002). "Genetic immunization using nanoparticles engineered from microemulsion precursors." Pharm Res **19**(7): 939-46.
- Davis, M. E., Pun, S. H., Bellocq, N. C., Reineke, T. M., Popielarski, S. R., Mishra, S. et Heidel, J. D. (2004). "Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers." Curr Med Chem **11**(2): 179-97.
- Davis, M. M. et Bjorkman, P. J. (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. et Chien, Y. (1998). "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 523-44.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O. et Moser, M. (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." J Exp Med **184**(4): 1413-24.
- Dees, E. C., McKinnon, K. P., Kuhns, J. J., Chwastiak, K. A., Sparks, S., Myers, M., Collins, E. J., Frelinger, J. A., Van Deventer, H., Collichio, F., Carey, L. A., Brecher, M. E., Graham, M., Earp, H. S. et Serody, J. S. (2004). "Dendritic cells can be rapidly expanded ex vivo and safely administered in patients with metastatic breast cancer." Cancer Immunol Immunother **53**(9): 777-85.
- Dehlin, E., Wormington, M., Korner, C. G. et Wahle, E. (2000). "Cap-dependent deadenylation of mRNA." Embo J **19**(5): 1079-86.
- Demeneix, B. A., Abdel-Taweb, H., Benoist, C., Seugnet, I. et Behr, J. P. (1994). "Temporal and spatial expression of lipospermine-compacted genes transferred into chick embryos in vivo." Biotechniques **16**(3): 496-501.
- Denis-Mize, K. S., Dupuis, M., MacKichan, M. L., Singh, M., Doe, B., O'Hagan, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., McDonald, D. M. et Ott, G. (2000). "Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells." Gene Ther **7**(24): 2105-12.



- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. et Bhardwaj, N. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." *J Exp Med* **193**(2): 233-8.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. et Reis e Sousa, C. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663): 1529-31.
- Diebold, S. S., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M. et Zenke, M. (1999). "Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells." *J Biol Chem* **274**(27): 19087-94.
- Dileo, J., Banerjee, R., Whitmore, M., Nayak, J. V., Falo, L. D., Jr. et Huang, L. (2003). "Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery to antigen-presenting cells results in enhanced anti-tumor immune responses." *Mol Ther* **7**(5 Pt 1): 640-8.
- Donnelly, J., Berry, K. et Ulmer, J. B. (2003). "Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines." *Int J Parasitol* **33**(5-6): 457-67.
- Drabick, J. J., Glasspool-Malone, J., King, A. et Malone, R. W. (2001). "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electroporation." *Mol Ther* **3**(2): 249-55.
- Duhra, P. et Ilchysyn, A. (1991). "Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo." *Clin Exp Dermatol* **16**(4): 303-5.
- Dunckley, T. et Parker, R. (1999). "The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif." *Embo J* **18**(19): 5411-22.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M. et Bhardwaj, N. (1999). "Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion." *J Immunol* **163**(12): 6762-8.
- Eppler, E., Horig, H., Kaufman, H. L., Groscurth, P. et Filgueira, L. (2002). "Carcinoembryonic antigen (CEA) presentation and specific T cell-priming by human dendritic cells transfected with CEA-mRNA." *Eur J Cancer* **38**(1): 184-93.
- Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J. L., Behr, J. P. et Remy, J. S. (1999). "Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI)." *J Gene Med* **1**(3): 210-22.
- Fassnacht, M., Lee, J., Milazzo, C., Boczkowski, D., Su, Z., Nair, S. et Gilboa, E. (2005). "Induction of CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to the human stromal antigen, fibroblast activation protein: implication for cancer immunotherapy." *Clin Cancer Res* **11**(15): 5566-71.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. et Danielsen, M. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7.
- Floch, V., Delepine, P., Guillaume, C., Loisel, S., Chasse, S., Le Bolc'h, G., Gobin, E., Leroy, J. P. et Ferec, C. (2000). "Systemic administration of cationic phospholipids/DNA complexes and the relationship between formulation and lung transfection efficiency." *Biochim Biophys Acta* **1464**(1): 95-103.
- Fujii, S., Shimizu, K., Fujimoto, K., Kiyokawa, T., Tsukamoto, A., Sanada, I. et Kawano, F. (2001). "Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells." *Leuk Lymphoma* **42**(3): 357-69.
- Fukui, M., Ueno, K., Suehiro, Y., Hamanaka, Y., Imai, K. et Hinoda, Y. (2006). "Anti-tumor activity of dendritic cells transfected with mRNA for receptor for hyaluronan-mediated motility is mediated by CD4+ T cells." *Cancer Immunol Immunother* **55**(5): 538-46.
- Gaensler, K. M., Tu, G., Bruch, S., Liggitt, D., Lipshutz, G. S., Metkus, A., Harrison, M., Heath, T. D. et Debs, R. J. (1999). "Fetal gene transfer by transuterine injection of cationic liposome-DNA complexes." *Nat Biotechnol* **17**(12): 1188-92.
- Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P. et Wilusz, J. (2000). "Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro." *Mol Cell* **5**(3): 479-88.
- Gao, M., Wilusz, C. J., Peltz, S. W. et Wilusz, J. (2001). "A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements." *Embo J* **20**(5): 1134-43.
- Gao, X. et Huang, L. (1991). "A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* **179**(1): 280-5.
- Gedde-Dahl, T., 3rd, Eriksen, J. A., Thorsby, E. et Gaudernack, G. (1992). "T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides." *Hum Immunol* **33**(4): 266-74.

- Gedde-Dahl, T., 3rd, Spurkland, A., Eriksen, J. A., Thorsby, E. et Gaudernack, G. (1992). "Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln-->Leu61)." Int Immunol **4**(11): 1331-7.
- Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N. et Hermine, O. (1998). "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells." J Exp Med **187**(6): 961-6.
- Ghosh, A. et Heston, W. D. (2004). "Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer." J Cell Biochem **91**(3): 528-39.
- Gjertsen, M. K., Bakka, A., Breivik, J., Saeterdal, I., Gedde-Dahl, T., 3rd, Stokke, K. T., Solheim, B. G., Egge, T. S., Soreide, O., Thorsby, E. et Gaudernack, G. (1996). "Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase I/II study." Int J Cancer **65**(4): 450-3.
- Gjertsen, M. K., Buanes, T., Rosseland, A. R., Bakka, A., Gladhaug, I., Soreide, O., Eriksen, J. A., Moller, M., Baksaas, I., Lothe, R. A., Saeterdal, I. et Gaudernack, G. (2001). "Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma." Int J Cancer **92**(3): 441-50.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J. et Osborne, B. A. (2000). Immunology, 4th edition. N.Y, W.H Freeman and Company.
- Golstein, P., Ojcius, D. M. et Young, J. D. (1991). "Cell death mechanisms and the immune system." Immunol Rev **121**: 29-65.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. et Dustin, M. L. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- Granstein, R. D., Ding, W. et Ozawa, H. (2000). "Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA." J Invest Dermatol **114**(4): 632-6.
- Green, P. J., Pines, O. et Inouye, M. (1986). "The role of antisense RNA in gene regulation." Annu Rev Biochem **55**: 569-97.
- Gregoriadis, G. (1998). "Genetic vaccines: strategies for optimization." Pharm Res **15**(5): 661-70.
- Groettrup, M. et Schmidtke, G. (1999). "Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation?" Drug Discov Today **4**(2): 63-71.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. et Liu, Y. J. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Gruber, A., Kan-Mitchell, J., Kuhen, K. L., Mukai, T. et Wong-Staal, F. (2000). "Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro." Blood **96**(4): 1327-33.
- Grunebach, F., Muller, M. R., Nencioni, A. et Brossart, P. (2003). "Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes." Gene Ther **10**(5): 367-74.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. et Amigorena, S. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
- Gunter, K. C., Khan, A. S. et Noguchi, P. D. (1993). "The safety of retroviral vectors." Hum Gene Ther **4**(5): 643-5.
- Guo, H., Karberg, M., Long, M., Jones, J. P., 3rd, Sullenger, B. et Lambowitz, A. M. (2000). "Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells." Science **289**(5478): 452-7.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. et Cavazzana-Calvo, M. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Harding, C. V. et Unanue, E. R. (1990). "Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation." Nature **346**(6284): 574-6.

- Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." *Blood* **90**(9): 3245-87.
- Hatefi, A., Megeed, Z. et Ghandehari, H. (2006). "Recombinant polymer-protein fusion: a promising approach towards efficient and targeted gene delivery." *J Gene Med* **8**(4): 468-76.
- Hattori, Y., Kawakami, S., Lu, Y., Nakamura, K., Yamashita, F. et Hashida, M. (2006). "Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration." *J Gene Med* **8**(7): 824-34.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. et Bauer, S. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-9.
- Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancey, D., Maurice, M. A., Lallas, C. D., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. et Vieweg, J. (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." *J Clin Invest* **109**(3): 409-17.
- Heiser, A., Maurice, M. A., Yancey, D. R., Coleman, D. M., Dahm, P. et Vieweg, J. (2001). "Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors." *Cancer Res* **61**(8): 3388-93.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. et Akira, S. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E. et Shortman, K. (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes." *J Immunol* **167**(2): 741-8.
- Hernando, J. J., Park, T. W., Kubler, K., Offergeld, R., Schlebusch, H. et Bauknecht, T. (2002). "Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial." *Cancer Immunol Immunother* **51**(1): 45-52.
- Hersey, P., Menzies, S. W., Halliday, G. M., Nguyen, T., Farrelly, M. L., DeSilva, C. et Lett, M. (2004). "Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **53**(2): 125-34.
- Hess, P. R., Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. et Gilboa, E. (2006). "Vaccination with mRNAs encoding tumor-associated antigens and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor efficiently primes CTL responses, but is insufficient to overcome tolerance to a model tumor/self antigen." *Cancer Immunol Immunother* **55**(6): 672-83.
- Hirschowitz, E. A., Foody, T., Kryscio, R., Dickson, L., Sturgill, J. et Yannelli, J. (2004). "Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **22**(14): 2808-15.
- Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. G. et Jung, G. (2000). "In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies." *Eur J Immunol* **30**(1): 1-7.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D. et Desjardins, M. (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." *Nature* **425**(6956): 402-6.
- Hsu, C. L. et Stevens, A. (1993). "Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4826-35.
- Hus, I., Rolinski, J., Tabarkiewicz, J., Wojas, K., Bojarska-Junak, A., Greiner, J., Giannopoulos, K., Dmoszynska, A. et Schmitt, M. (2005). "Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia* **19**(9): 1621-7.
- Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. et Ikehara, S. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." *J Immunol* **163**(3): 1409-19.
- Itoh, T., Ueda, Y., Kawashima, I., Nukaya, I., Fujiwara, H., Fuji, N., Yamashita, T., Yoshimura, T., Okugawa, K., Iwasaki, T., Ideno, M., Takesako, K., Mitsuhashi, M., Orita, K. et Yamagishi, H. (2002). "Immunotherapy of solid cancer using dendritic cells pulsed with the HLA-A24-restricted peptide of carcinoembryonic antigen." *Cancer Immunol Immunother* **51**(2): 99-106.
- Izant, J. G. et Weintraub, H. (1985). "Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA." *Science* **229**(4711): 345-52.
- Jacob, F. et Monod, J. (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *J Mol Biol* **3**: 318-56.

- Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilseemann, C., Hagedorn, M. et Knuth, A. (1996). "Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens." Int J Cancer **66**(2): 162-9.
- Jaksits, S., Kriehuber, E., Charbonnier, A. S., Rappersberger, K., Stingl, G. et Maurer, D. (1999). "CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner." J Immunol **163**(9): 4869-77.
- Jenne, L., Arrighi, J. F., Jonuleit, H., Saurat, J. H. et Hauser, C. (2000). "Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis." Cancer Res **60**(16): 4446-52.
- Jenne, L., Hauser, C., Arrighi, J. F., Saurat, J. H. et Hugin, A. W. (2000). "Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function." Gene Ther **7**(18): 1575-83.
- Jia, L., Kovacs, J. R., Zheng, Y., Gawalt, E. S., Shen, H. et Meng, W. S. (2006). "Attenuated alloreactivity of dendritic cells engineered with surface-modified microspheres carrying a plasmid encoding interleukin-10." Biomaterials **27**(9): 2076-82.
- Jilek, S., Merkle, H. P. et Walter, E. (2005). "DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells." Adv Drug Deliv Rev **57**(3): 377-90.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J. et Enk, A. H. (2001). "A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection." Int J Cancer **93**(2): 243-51.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y. et Liu, Y. J. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
- Kalady, M. F., Onaitis, M. W., Emani, S., Abdel-Wahab, Z., Tyler, D. S. et Pruitt, S. K. (2004). "Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity." J Surg Res **116**(1): 24-31.
- Kalady, M. F., Onaitis, M. W., Padilla, K. M., Emani, S., Tyler, D. S. et Pruitt, S. K. (2002). "Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy." J Surg Res **105**(1): 17-24.
- Kalat, M., Kupcu, Z., Schuller, S., Zalusky, D., Zehetner, M., Paster, W. et Schweighoffer, T. (2002). "In vivo plasmid electroporation induces tumor antigen-specific CD8+ T-cell responses and delays tumor growth in a syngeneic mouse melanoma model." Cancer Res **62**(19): 5489-94.
- Kamata, M., Denda-Nagai, K., Kubota, N., Aida, S., Takeda, K. et Irimura, T. (2002). "Vaccination of mice with MUC1 cDNA suppresses the development of lung metastases." Clin Exp Metastasis **19**(8): 689-96.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. et Weissman, D. (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." J Biol Chem **279**(13): 12542-50.
- Karmali, P. P., Majeti, B. K., Sreedhar, B. et Chaudhuri, A. (2006). "In vitro gene transfer efficacies and serum compatibility profiles of novel mono-, di-, and tri-histidinylated cationic transfection lipids: a structure-activity investigation." Bioconjug Chem **17**(1): 159-71.
- Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. et Kiessling, R. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.
- Kawakami, S., Sato, A., Nishikawa, M., Yamashita, F. et Hashida, M. (2000). "Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes." Gene Ther **7**(4): 292-9.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T. et Rosenberg, S. A. (1994). "Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3515-9.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J. R., Adema, G. J., Miki, T. et Rosenberg, S. A. (1994). "Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6458-62.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Appella, E. et Rosenberg, S. A. (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." J Immunol **154**(8): 3961-8.
- Khanna, R., Burrows, S. R., Nicholls, J. et Poulsen, L. M. (1998). "Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1):

- evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes." *Eur J Immunol* **28**(2): 451-8.
- Kichler, A., Freulon, I., Boutin, V., Mayer, R., Monsigny, M. et Midoux, P. (1999). "Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency." *J Gene Med* **1**(2): 134-43.
- Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. et Danos, O. (2001). "Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study." *J Gene Med* **3**(2): 135-44.
- Kichler, A., Leborgne, C., Marz, J., Danos, O. et Bechinger, B. (2003). "Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1564-8.
- Kikumori, T., Cote, G. J. et Gagel, R. F. (2001). "Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy?" *Hum Gene Ther* **12**(11): 1429-41.
- Kim, J. J., Yang, J. S., Nottingham, L. K., Tang, W., Dang, K., Manson, K. H., Wyand, M. S., Wilson, D. M. et Weiner, D. B. (2001). "Induction of immune responses and safety profiles in rhesus macaques immunized with a DNA vaccine expressing human prostate specific antigen." *Oncogene* **20**(33): 4497-506.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L. et Yokoyama, W. M. (2000). "In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2731-6.
- Kim, T. W., Hung, C. F., Ling, M., Juang, J., He, L., Hardwick, J. M., Kumar, S. et Wu, T. C. (2003). "Enhancing DNA vaccine potency by coadministration of DNA encoding antiapoptotic proteins." *J Clin Invest* **112**(1): 109-17.
- Klinman, D. M., Takeno, M., Ichino, M., Gu, M., Yamshchikov, G., Mor, G. et Conover, J. (1997). "DNA vaccines: safety and efficacy issues." *Springer Semin Immunopathol* **19**(2): 245-56.
- Klinman, D. M., Yamshchikov, G. et Ishigatsubo, Y. (1997). "Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines." *J Immunol* **158**(8): 3635-9.
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G. et Maurer, D. (1999). "Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines." *J Immunol* **163**(6): 3250-9.
- Koido, S., Kashiwaba, M., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D. et Gong, J. (2000). "Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA." *J Immunol* **165**(10): 5713-9.
- Kono, K., Takahashi, A., Sugai, H., Fujii, H., Choudhury, A. R., Kiessling, R. et Matsumoto, Y. (2002). "Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer." *Clin Cancer Res* **8**(11): 3394-400.
- Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., Schuler, G., Hauber, J. et Steinkasserer, A. (2000). "Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity." *J Virol* **74**(15): 7127-36.
- Kumar, V. V., Pichon, C., Refregiers, M., Guerin, B., Midoux, P. et Chaudhuri, A. (2003). "Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH." *Gene Ther* **10**(15): 1206-15.
- Kyte, J. A., Mu, L., Aamdal, S., Kvalheim, G., Dueland, S., Hauser, M., Gullestad, H. P., Ryder, T., Lislerud, K., Hammerstad, H. et Gaudernack, G. (2006). "Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA." *Cancer Gene Ther*.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 359-93.
- Lanzavecchia, A. et Sallusto, F. (2000). "From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation." *Curr Opin Immunol* **12**(1): 92-8.
- Larregina, A. T., Watkins, S. C., Erdos, G., Spencer, L. A., Storkus, W. J., Beer Stolz, D. et Falo, L. D., Jr. (2001). "Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells." *Gene Ther* **8**(8): 608-17.
- Lasic, T. e. (2000).
- Lau, R., Wang, F., Jeffery, G., Marty, V., Kuniyoshi, J., Bade, E., Ryback, M. E. et Weber, J. (2001). "Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma." *J Immunother* **24**(1): 66-78.
- Lauterbach, H., Gruber, A., Ried, C., Cheminay, C. et Bockler, T. (2006). "Insufficient APC capacities of dendritic cells in gene gun-mediated DNA vaccination." *J Immunol* **176**(8): 4600-7.
- Lee, D. (2003). "Autologous dendritic cells pulsed with prostatic acid phosphatase (APC8015) for patients with hormone-refractory prostate cancer with a Gleason score  $\leq 7$ ." *Clin Prostate Cancer* **2**(2): 81-3.

- Leng, Q., Scaria, P., Zhu, J., Ambulos, N., Campbell, P. et Mixson, A. J. (2005). "Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA." *J Gene Med* **7**(7): 977-86.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L. et Bluestone, J. A. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." *Annu Rev Immunol* **14**: 233-58.
- Lethe, B., van der Bruggen, P., Brasseur, F. et Boon, T. (1997). "MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte." *Melanoma Res* **7 Suppl 2**: S83-8.
- Lewis, P. J. et Babiuk, L. A. (1999). "DNA vaccines: a review." *Adv Virus Res* **54**: 129-88.
- Liao, X., Li, Y., Bonini, C., Nair, S., Gilboa, E., Greenberg, P. D. et Yee, C. (2004). "Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes." *Mol Ther* **9**(5): 757-64.
- Liu, M. (1998). "Transfected human dendritic cells as cancer vaccines." *Nat Biotechnol* **16**(4): 335-6.
- Liu, Y., Thor, A., Shtivelman, E., Cao, Y., Tu, G., Heath, T. D. et Debs, R. J. (1999). "Systemic gene delivery expands the repertoire of effective antiangiogenic agents." *J Biol Chem* **274**(19): 13338-44.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." *Annu Rev Immunol* **17**: 875-904.
- Lundqvist, A., Noffz, G., Pavlenko, M., Saeboe-Larssen, S., Fong, T., Maitland, N. et Pisa, P. (2002). "Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection." *J Immunother* **25**(6): 445-54.
- Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J. L., Kohler, G., Noppen, C., Herr, W., Spagnoli, G. C., Cerundolo, V. et Lindemann, A. (2000). "Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." *Int J Cancer* **86**(3): 385-92.
- Mackensen, A., Krause, T., Blum, U., Uhrmeister, P., Mertelsmann, R. et Lindemann, A. (1999). "Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Cancer Immunol Immunother* **48**(2-3): 118-22.
- Maier, T., Tun-Kyi, A., Tassis, A., Jungius, K. P., Burg, G., Dummer, R. et Nestle, F. O. (2003). "Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells." *Blood* **102**(7): 2338-44.
- Mailliard, R. B., Son, Y. I., Redlinger, R., Coates, P. T., Giermasz, A., Morel, P. A., Storkus, W. J. et Kalinski, P. (2003). "Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function." *J Immunol* **171**(5): 2366-73.
- Mailliard, R. B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilken, C. M., Kapsenberg, M. L., Kirkwood, J. M., Storkus, W. J. et Kalinski, P. (2004). "alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity." *Cancer Res* **64**(17): 5934-7.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. et van der Bruggen, P. (1997). "A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma." *J Exp Med* **186**(5): 785-93.
- Manickan, E., Kanangat, S., Rouse, R. J., Yu, Z. et Rouse, B. T. (1997). "Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells." *J Leukoc Biol* **61**(2): 125-32.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. et Akashi, K. (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." *Blood* **97**(11): 3333-41.
- Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P. et Boon, T. (1999). "Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1." *Int J Cancer* **80**(2): 219-30.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. et Sallusto, F. (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* **5**(12): 1260-5.
- Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magne, R., Gomard, E., Guillet, J. G., Levy, J. P. et Meulien, P. (1993). "Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA." *Eur J Immunol* **23**(7): 1719-22.

- Mason, K. A., Ariga, H., Neal, R., Valdecanas, D., Hunter, N., Krieg, A. M., Whisnant, J. K. et Milas, L. (2005). "Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy." *Clin Cancer Res* **11**(1): 361-9.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debre, P. et Hosmalin, A. (1995). "Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients." *J Virol* **69**(8): 4737-45.
- McKenzie, D. L., Smiley, E., Kwok, K. Y. et Rice, K. G. (2000). "Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers." *Bioconjug Chem* **11**(6): 901-9.
- Meuli-Simmen, C., Liu, Y., Yeo, T. T., Liggitt, D., Tu, G., Yang, T., Meuli, M., Knauer, S., Heath, T. D., Longo, F. M. et Debs, R. J. (1999). "Gene expression along the cerebral-spinal axis after regional gene delivery." *Hum Gene Ther* **10**(16): 2689-700.
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J. C. et Monsigny, M. (1998). "Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines." *Bioconjug Chem* **9**(2): 260-7.
- Midoux, P. et Monsigny, M. (1999). "Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes." *Bioconjug Chem* **10**(3): 406-11.
- Miller, J. S. (2001). "The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy." *Exp Hematol* **29**(10): 1157-68.
- Montier, T., Delepine, P., Le Ny, K., Fichou, Y., Le Bris, M., Hardy, E., Picquet, E., Clement, J. C., Yaouanc, J. J. et Ferec, C. (2004). "KLN-5: a safe monocationic lipophosphoramidate to transfect efficiently haematopoietic cell lines and human CD34+ cells." *Biochim Biophys Acta* **1665**(1-2): 118-33.
- Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., Gairin, J. E. et Van den Eynde, B. J. (2000). "Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells." *Immunity* **12**(1): 107-17.
- Morisaki, T., Matsumoto, K., Kuroki, H., Kubo, M., Baba, E., Onishi, H., Tasaki, A., Nakamura, M., Inaba, S. et Katano, M. (2003). "Combined immunotherapy with intracavitary injection of activated lymphocytes, monocyte-derived dendritic cells and low-dose OK-432 in patients with malignant effusion." *Anticancer Res* **23**(6a): 4459-65.
- Morse, M. A., Deng, Y., Coleman, D., Hull, S., Kitrell-Fisher, E., Nair, S., Schlom, J., Ryback, M. E. et Lyster, H. K. (1999). "A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen." *Clin Cancer Res* **5**(6): 1331-8.
- Morse, M. A., Nair, S. K., Mosca, P. J., Hobeika, A. C., Clay, T. M., Deng, Y., Boczkowski, D., Proia, A., Neidzwiecki, D., Clavien, P. A., Hurwitz, H. I., Schlom, J., Gilboa, E. et Lyster, H. K. (2003). "Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA." *Cancer Invest* **21**(3): 341-9.
- Mu, L. J., Kyte, J. A., Kvalheim, G., Aamdal, S., Dueland, S., Hauser, M., Hammerstad, H., Waehre, H., Raabe, N. et Gaudernack, G. (2005). "Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients." *Br J Cancer* **93**(7): 749-56.
- Mu, L. J., Lazarova, P., Gaudernack, G., Saeboe-Larssen, S. et Kvalheim, G. (2004). "Development of a clinical grade procedure for generation of mRNA transfected dendritic cells from purified frozen CD34(+) blood progenitor cells." *Int J Immunopathol Pharmacol* **17**(3): 255-63.
- Mullins, D. W., Sheasley, S. L., Ream, R. M., Bullock, T. N., Fu, Y. X. et Engelhard, V. H. (2003). "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control." *J Exp Med* **198**(7): 1023-34.
- Murphy, G., Tjoa, B., Ragde, H., Kenny, G. et Boynton, A. (1996). "Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen." *Prostate* **29**(6): 371-80.
- Nagayama, H., Sato, K., Morishita, M., Uchimaru, K., Oyaizu, N., Inazawa, T., Yamasaki, T., Enomoto, M., Nakaoka, T., Nakamura, T., Maekawa, T., Yamamoto, A., Shimada, S., Saida, T., Kawakami, Y., Asano, S., Tani, K., Takahashi, T. A. et Yamashita, N. (2003). "Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2." *Melanoma Res* **13**(5): 521-30.
- Nair, S. K. (1998). "Immunotherapy of cancer with dendritic cell-based vaccines." *Gene Ther* **5**(11): 1445-6.

- Nair, S. K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R. I., Lyster, H. K. et Gilboa, E. (1998). "Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA." *Nat Biotechnol* **16**(4): 364-9.
- Nair, S. K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J. S., Vieweg, J. et Gilboa, E. (2000). "Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells." *Nat Med* **6**(9): 1011-7.
- Nair, S. K., Morse, M., Boczkowski, D., Cumming, R. I., Vasovic, L., Gilboa, E. et Lyster, H. K. (2002). "Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells." *Ann Surg* **235**(4): 540-9.
- Nakano, H., Yanagita, M. et Gunn, M. D. (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **194**(8): 1171-8.
- Nelson, E. L., Strobl, S., Subleski, J., Prieto, D., Kopp, W. C. et Nelson, P. J. (1999). "Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF-alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation." *Faseb J* **13**(14): 2021-30.
- Nestle, F. O., Aljaghi, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. et Schadendorf, D. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* **4**(3): 328-32.
- Nomura, M., Nakata, Y., Inoue, T., Uzawa, A., Itamura, S., Nerome, K., Akashi, M. et Suzuki, G. (1996). "In vivo induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule." *J Immunol Methods* **193**(1): 41-9.
- O'Rourke, M. G., Johnson, M., Lanagan, C., See, J., Yang, J., Bell, J. R., Slater, G. J., Kerr, B. M., Crowe, B., Purdie, D. M., Elliott, S. L., Ellem, K. A. et Schmidt, C. W. (2003). "Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine." *Cancer Immunol Immunother* **52**(6): 387-95.
- Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R. et Wagner, E. (1999). "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." *Gene Ther* **6**(4): 595-605.
- Okuda, T., Sugiyama, A., Niidome, T. et Aoyagi, H. (2004). "Characters of dendritic poly(L-lysine) analogues with the terminal lysines replaced with arginines and histidines as gene carriers in vitro." *Biomaterials* **25**(3): 537-44.
- Onaitis, M. W., Kalady, M. F., Emani, S., Abdel-Wahab, Z., Tyler, D. S. et Pruitt, S. K. (2003). "CD40 ligand is essential for generation of specific cytotoxic T cell responses in RNA-pulsed dendritic cell immunotherapy." *Surgery* **134**(2): 300-5.
- Ott, G., Singh, M., Kazzaz, J., Briones, M., Soenawan, E., Ugozzoli, M. et O'Hagan, D. T. (2002). "A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines." *J Control Release* **79**(1-3): 1-5.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. et Colombo, M. P. (1996). "Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo." *J Exp Med* **183**(1): 317-22.
- Pandha, H. S., John, R. J., Hutchinson, J., James, N., Whelan, M., Corbishley, C. et Dalglish, A. G. (2004). "Dendritic cell immunotherapy for urological cancers using cryopreserved allogeneic tumour lysate-pulsed cells: a phase I/II study." *BJU Int* **94**(3): 412-8.
- Panelli, M. C., Wunderlich, J., Jeffries, J., Wang, E., Mixon, A., Rosenberg, S. A. et Marincola, F. M. (2000). "Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100." *J Immunother* **23**(4): 487-98.
- Patel, M., Vivien, E., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Ramasawmy, R., Vigneron, J. P., Lehn, P. et Lehn, J. M. (2001). "Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations." *Biochem Biophys Res Commun* **281**(2): 536-43.
- Paul, S. (2003). "Technology evaluation: CpG-7909, Coley." *Curr Opin Mol Ther* **5**(5): 553-9.
- Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M. F. et Slamon, D. J. (1996). "Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization." *Oncogene* **13**(1): 63-72.
- Pecher, G., Haring, A., Kaiser, L. et Thiel, E. (2002). "Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial." *Cancer Immunol Immunother* **51**(11-12): 669-73.



- Pecher, G., Spahn, G., Schirrmann, T., Kulbe, H., Ziegner, M., Schenk, J. A. et Sandig, V. (2001). "Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus." *Anticancer Res* **21**(4A): 2591-6.
- Pestka, S., Daugherty, B. L., Jung, V., Hotta, K. et Pestka, R. K. (1984). "Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(23): 7525-8.
- Philip, R., Brunette, E., Ashton, J., Alters, S., Gadea, J., Sorich, M., Yau, J., O'Donoghue, G., Lebkowski, J., Okarma, T. et Philip, M. (1998). "Transgene expression in dendritic cells to induce antigen-specific cytotoxic T cells in healthy donors." *Cancer Gene Ther* **5**(4): 236-46.
- Pichon, C., Goncalves, C. et Midoux, P. (2001). "Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery." *Adv Drug Deliv Rev* **53**(1): 75-94.
- Pichon, C., LeCam, E., Guerin, B., Coulaud, D., Delain, E. et Midoux, P. (2002). "Poly[Lys-(AEDTP)]: a cationic polymer that allows dissociation of pDNA/cationic polymer complexes in a reductive medium and enhances polyfection." *Bioconjug Chem* **13**(1): 76-82.
- Pichon, C., Roufai, M. B., Monsigny, M. et Midoux, P. (2000). "Histidylated oligolysines increase the transmembrane passage and the biological activity of antisense oligonucleotides." *Nucleic Acids Res* **28**(2): 504-12.
- Pimm, M. V. et Baldwin, R. W. (1976). "Treatment of transplanted rat tumours with double-stranded RNA(BRL 5907). II. Treatment of pleural and peritoneal growths." *Br J Cancer* **33**(2): 166-71.
- Pimm, M. V., Embleton, M. J. et Baldwin, R. W. (1976). "Treatment of transplanted rat tumours with double-stranded RNA (BRL 5907). I. Influenced of systemic and local administration." *Br J Cancer* **33**(2): 154-65.
- Pitard, B., Oudrhiri, N., Vigneron, J. P., Hauchecorne, M., Aguerre, O., Toury, R., Airiau, M., Ramasawmy, R., Scherman, D., Crouzet, J., Lehn, J. M. et Lehn, P. (1999). "Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2621-6.
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C. et Romero, P. (1999). "High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals." *J Exp Med* **190**(5): 705-15.
- Porcelli, S. A. et Modlin, R. L. (1999). "The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids." *Annu Rev Immunol* **17**: 297-329.
- Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., Barber, B. H., Restifo, N. P. et Germain, R. N. (1998). "Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization." *J Exp Med* **188**(6): 1075-82.
- Press, M. F., Bernstein, L., Thomas, P. A., Meisner, L. F., Zhou, J. Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R. A., Harris, C., El-Naggar, A., Slamon, D. J., Phillips, R. N., Ross, J. S., Wolman, S. R. et Flom, K. J. (1997). "HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas." *J Clin Oncol* **15**(8): 2894-904.
- Putnam, D., Gentry, C. A., Pack, D. W. et Langer, R. (2001). "Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1200-5.
- Putnam, D., Zelikin, A. N., Izumrudov, V. A. et Langer, R. (2003). "Polyhistidine-PEG:DNA nanocomposites for gene delivery." *Biomaterials* **24**(24): 4425-33.
- Qiu, P., Ziegelhoffer, P., Sun, J. et Yang, N. S. (1996). "Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization." *Gene Ther* **3**(3): 262-8.
- Rains, N., Cannan, R. J., Chen, W. et Stubbs, R. S. (2001). "Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal cancer." *Hepatogastroenterology* **48**(38): 347-51.
- Read, M. L., Singh, S., Ahmed, Z., Stevenson, M., Briggs, S. S., Oupicky, D., Barrett, L. B., Spice, R., Kendall, M., Berry, M., Preece, J. A., Logan, A. et Seymour, L. W. (2005). "A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids." *Nucleic Acids Res* **33**(9): e86.
- Reth, M. (1995). "The B-cell antigen receptor complex and co-receptors." *Immunol Today* **16**(7): 310-3.
- Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E. et Rosenberg, S. A. (1996). "A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes." *J Exp Med* **183**(3): 1185-92.
- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T. et Goldberg, A. L. (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." *Adv Immunol* **80**: 1-70.

- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. et Schuler, G. (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." *J Immunol Methods* **196**(2): 137-51.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. et White, D. E. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Nat Med* **4**(3): 321-7.
- Rosenberg, S. A., Zhai, Y., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., Roberts, B. et White, D. E. (1998). "Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens." *J Natl Cancer Inst* **90**(24): 1894-900.
- Roskrow, M. A., Suzuki, N., Gan, Y., Sixbey, J. W., Ng, C. Y., Kimbrough, S., Hudson, M., Brenner, M. K., Heslop, H. E. et Rooney, C. M. (1998). "Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease." *Blood* **91**(8): 2925-34.
- Rouse, R. J., Nair, S. K., Lydy, S. L., Bowen, J. C. et Rouse, B. T. (1994). "Induction in vitro of primary cytotoxic T-lymphocyte responses with DNA encoding herpes simplex virus proteins." *J Virol* **68**(9): 5685-9.
- Ruggetti, A., Biffoni, M., Sabbatucci, M., Rahimi, H., Pellicciotta, I., Fattorossi, A., Pierelli, L., Scambia, G., Lavitrano, M., Frati, L. et Nuti, M. (2000). "Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity." *Gene Ther* **7**(17): 1458-66.
- Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., Akiyoshi, T. et Mori, M. (2001). "Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas." *Clin Cancer Res* **7**(8): 2277-84.
- Saeboe-Larsen, S., Fossberg, E. et Gaudernack, G. (2002). "mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT)." *J Immunol Methods* **259**(1-2): 191-203.
- Salio, M., Cella, M., Suter, M. et Lanzavecchia, A. (1999). "Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus." *Eur J Immunol* **29**(10): 3245-53.
- Sallusto, F. et Lanzavecchia, A. (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., Schaeferli, P., Loetscher, P., Scharniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S. et Lanzavecchia, A. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* **28**(9): 2760-9.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. et Raz, E. (1996). "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization." *Science* **273**(5273): 352-4.
- Scandella, E., Men, Y., Gillesen, S., Forster, R. et Groettrup, M. (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **100**(4): 1354-61.
- Scheibenbogen, C., Schmittel, A., Keilholz, U., Allgauer, T., Hofmann, U., Max, R., Thiel, E. et Schadendorf, D. (2000). "Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma." *J Immunother* **23**(2): 275-81.
- Schleef, M. et Schmidt, T. (2004). "Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications." *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S45-53.
- Schott, M., Feldkamp, J., Lettmann, M., Simon, D., Scherbaum, W. A. et Seissler, J. (2001). "Dendritic cell immunotherapy in a neuroendocrine pancreas carcinoma." *Clin Endocrinol (Oxf)* **55**(2): 271-7.
- Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Figdor, C. G. et Adema, G. J. (1998). "Genetic vaccination against the melanocyte lineage-specific antigen gp100 induces cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor protection." *Cancer Res* **58**(12): 2509-14.
- Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Figdor, C. G. et Adema, G. J. (1999). "Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells." *Eur J Immunol* **29**(9): 2835-41.
- Schuler-Thurner, B., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Bender, A., Maczek, C., Jonuleit, H., Roder, C., Haendle, I., Leisgang, W., Dunbar, R., Cerundolo, V., von Den Driesch, P., Knop, J., Brocker, M. (2002). "Dendritic cell vaccination with a melanocyte-specific antigen gp100 peptide induces a strong and long-lasting antitumor response." *J Clin Invest* **110**(12): 1751-61.

- E. B., Enk, A., Kampgen, E. et Schuler, G. (2000). "Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **165**(6): 3492-6.
- Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N. et Schuler, G. (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells." *J Exp Med* **195**(10): 1279-88.
- Schuler, G., Schuler-Thurner, B. et Steinman, R. M. (2003). "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy." *Curr Opin Immunol* **15**(2): 138-47.
- Shevach, E. M. (2001). "Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells." *J Exp Med* **193**(11): F41-6.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. et Liu, Y. J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Sijts, A. J., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U. et Kloetzel, P. M. (2000). "Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes." *J Exp Med* **191**(3): 503-14.
- Sijts, A. J., Standera, S., Toes, R. E., Ruppert, T., Beekman, N. J., van Veelen, P. A., Ossendorp, F. A., Melief, C. J. et Kloetzel, P. M. (2000). "MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells." *J Immunol* **164**(9): 4500-6.
- Singh, R. S., Goncalves, C., Sandrin, P., Pichon, C., Midoux, P. et Chaudhuri, A. (2004). "On the gene delivery efficacies of pH-sensitive cationic lipids via endosomal protonation: a chemical biology investigation." *Chem Biol* **11**(5): 713-23.
- Slingluff, C. L., Jr., Petroni, G. R., Yamshchikov, G. V., Barnd, D. L., Eastham, S., Galavotti, H., Patterson, J. W., Deacon, D. H., Hibbitts, S., Teates, D., Neese, P. Y., Grosh, W. W., Chianese-Bullock, K. A., Woodson, E. M., Wiernasz, C. J., Merrill, P., Gibson, J., Ross, M. et Engelhard, V. H. (2003). "Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells." *J Clin Oncol* **21**(21): 4016-26.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y. et Godfrey, D. I. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* **191**(4): 661-8.
- Solodin, I., Brown, C. S., Bruno, M. S., Chow, C. Y., Jang, E. H., Debs, R. J. et Heath, T. D. (1995). "A novel series of amphiphilic imidazolium compounds for in vitro and in vivo gene delivery." *Biochemistry* **34**(41): 13537-44.
- Soloski, M. J. (2001). "Recognition of tumor cells by the innate immune system." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 154-62.
- Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J. J., Gilbert, R. A., Heller, R., Jaroszeski, M. J. et Malone, R. W. (2000). "Theory and in vivo application of electroporative gene delivery." *Mol Ther* **2**(3): 178-87.
- Spies, B., Hochrein, H., Vabulas, M., Huster, K., Busch, D. H., Schmitz, F., Heit, A. et Wagner, H. (2003). "Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice." *J Immunol* **171**(11): 5908-12.
- Staedel, C., Remy, J. S., Hua, Z., Broker, T. R., Chow, L. T. et Behr, J. P. (1994). "High-efficiency transfection of primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine:DNA complexes." *J Invest Dermatol* **102**(5): 768-72.
- Steinman, R. M. et Cohn, Z. A. (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-62.
- Steitz, J., Britten, C. M., Wolfel, T. et Tuting, T. (2006). "Effective induction of anti-melanoma immunity following genetic vaccination with synthetic mRNA coding for the fusion protein EGFP.TRP2." *Cancer Immunol Immunother* **55**(3): 246-53.
- Stift, A., Sachet, M., Yagubian, R., Bittermann, C., Dubsky, P., Brostjan, C., Pfragner, R., Niederle, B., Jakesz, R., Gnant, M. et Friedl, J. (2004). "Dendritic cell vaccination in medullary thyroid carcinoma." *Clin Cancer Res* **10**(9): 2944-53.
- Strobel, I., Berchtold, S., Gotze, A., Schulze, U., Schuler, G. et Steinkasserer, A. (2000). "Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes." *Gene Ther* **7**(23): 2028-35.

- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. et Vieweg, J. (2003). "Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells." Cancer Res **63**(9): 2127-33.
- Su, Z., Dannull, J., Yang, B. K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E. et Vieweg, J. (2005). "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." J Immunol **174**(6): 3798-807.
- Su, Z., Vieweg, J., Weizer, A. Z., Dahm, P., Yancey, D., Turaga, V., Higgins, J., Boczkowski, D., Gilboa, E. et Dannull, J. (2002). "Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product." Cancer Res **62**(17): 5041-8.
- Svane, I. M., Pedersen, A. E., Johnsen, H. E., Nielsen, D., Kamby, C., Gaarsdal, E., Nikolajsen, K., Buus, S. et Claesson, M. H. (2004). "Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study." Cancer Immunol Immunother **53**(7): 633-41.
- Szabolcs, P., Gallardo, H. F., Ciocon, D. H., Sadelain, M. et Young, J. W. (1997). "Retrovirally transduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T-cell stimulatory capacity." Blood **90**(6): 2160-7.
- Tan, P. H., Beutelspacher, S. C., Wang, Y. H., McClure, M. O., Ritter, M. A., Lombardi, G. et George, A. J. (2005). "Immunolipoplexes: an efficient, nonviral alternative for transfection of human dendritic cells with potential for clinical vaccination." Mol Ther **11**(5): 790-800.
- Templeton, N. S. et Lasic, D. D. (2000). "Bioorganic colloids, macromolecules, DNA, self-assembled particles and their complexes." Gene Therapy: 241-266.
- Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J. et Sherman, L. A. (1995). "Targeting p53 as a general tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 11993-7.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. et Amigorena, S. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-18.
- Thierry, A. R., Abes, S., Resina, S., Travo, A., Richard, J. P., Prevot, P. et Lebleu, B. (2006). "Comparison of basic peptides- and lipid-based strategies for the delivery of splice correcting oligonucleotides." Biochim Biophys Acta **1758**(3): 364-74.
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Bocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. et Schuler, G. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**(11): 1669-78.
- Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A. et Schuler, G. (1999). "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." J Immunol Methods **223**(1): 1-15.
- Tindle, R. W. (1996). "Human papillomavirus vaccines for cervical cancer." Curr Opin Immunol **8**(5): 643-50.
- Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y. et Rosenberg, S. A. (1994). "Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9461-5.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. et Weissman, I. L. (2000). "Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor." Science **290**(5499): 2152-4.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L. et Parker, R. (2001). "The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*." Cell **104**(3): 377-86.
- Tuting, T., Wilson, C. C., Martin, D. M., Kasamon, Y. L., Rowles, J., Ma, D. I., Slingluff, C. L., Jr., Wagner, S. N., van der Bruggen, P., Baar, J., Lotze, M. T. et Storkus, W. J. (1998). "Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha." J Immunol **160**(3): 1139-47.
- U'Ren, L., Kedl, R. et Dow, S. (2006). "Vaccination with liposome-DNA complexes elicits enhanced antitumor immunity." Cancer Gene Ther.

- Ueda, Y., Itoh, T., Nukaya, I., Kawashima, I., Okugawa, K., Yano, Y., Yamamoto, Y., Naitoh, K., Shimizu, K., Imura, K., Fuji, N., Fujiwara, H., Ochiai, T., Itoi, H., Sonoyama, T., Hagiwara, A., Takesako, K. et Yamagishi, H. (2004). "Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas." *Int J Oncol* **24**(4): 909-17.
- Ueno, H., Tcherepanova, I., Reygrobellet, O., Laughner, E., Ventura, C., Palucka, A. K. et Banchereau, J. (2004). "Dendritic cell subsets generated from CD34+ hematopoietic progenitors can be transfected with mRNA and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses." *J Immunol Methods* **285**(2): 171-80.
- Ulmer, J. B. (2001). "An update on the state of the art of DNA vaccines." *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**(2): 192-7.
- Usman, N. et Blatt, L. M. (2000). "Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics." *J Clin Invest* **106**(10): 1197-202.
- Uster, P. S. et Deamer, D. W. (1985). "pH-dependent fusion of liposomes using titratable polycations." *Biochemistry* **24**(1): 1-8.
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S. et Boon, T. (1995). "A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *J Exp Med* **182**(3): 689-98.
- Van den Eynde, B. J. et Morel, S. (2001). "Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 147-53.
- Van den Eynde, B. J. et van der Bruggen, P. (1997). "T cell defined tumor antigens." *Curr Opin Immunol* **9**(5): 684-93.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. et Boon, T. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-7.
- van der Burg, S. H., Visseren, M. J., Brandt, R. M., Kast, W. M. et Melief, C. J. (1996). "Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability." *J Immunol* **156**(9): 3308-14.
- van Elsas, A., van der Burg, S. H., van der Minne, C. E., Borghi, M., Mourer, J. S., Melief, C. J. et Schrier, P. I. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A\*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen." *Eur J Immunol* **26**(8): 1683-9.
- Van Meirvenne, S., Straetman, L., Heirman, C., Dullaers, M., De Greef, C., Van Tendeloo, V. et Thielemans, K. (2002). "Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA." *Cancer Gene Ther* **9**(9): 787-97.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R. et Berneman, Z. N. (2001). "Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells." *Blood* **98**(1): 49-56.
- Van Tendeloo, V. F., Snoeck, H. W., Lardon, F., Vanham, G. L., Nijs, G., Lenjou, M., Hendriks, L., Van Broeckhoven, C., Moulijn, A., Rodrigus, I., Verdonk, P., Van Bockstaele, D. R. et Berneman, Z. N. (1998). "Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells." *Gene Ther* **5**(5): 700-7.
- Van Tendeloo, V. F., Willems, R., Ponsaerts, P., Lenjou, M., Nijs, G., Vanhove, M., Muylaert, P., Van Cauwelaert, P., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R. et Berneman, Z. N. (2000). "High-level transgene expression in primary human T lymphocytes and adult bone marrow CD34+ cells via electroporation-mediated gene delivery." *Gene Ther* **7**(16): 1431-7.
- Vigneron, J. P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J. C., Basseville, M., Lehn, P. et Lehn, J. M. (1996). "Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9682-6.
- Vilella, R., Benitez, D., Mila, J., Lozano, M., Vilana, R., Pomes, J., Tomas, X., Costa, J., Vilalta, A., Malveyh, J., Puig, S., Mellado, B., Marti, R. et Castel, T. (2004). "Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate." *Cancer Immunol Immunother* **53**(7): 651-8.
- Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L. et Nadler, L. M. (1999). "The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." *Immunity* **10**(6): 673-9.

- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L. et Shortman, K. (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." *J Immunol* **164**(6): 2978-86.
- Wagner, H. (1999). "Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger." *Adv Immunol* **73**: 329-68.
- Wang, C. Y. et Huang, L. (1984). "Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes." *Biochemistry* **23**(19): 4409-16.
- Wang, R. F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X. et Rosenberg, S. A. (1996). "Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **184**(6): 2207-16.
- Watanabe, T. et Sullenger, B. A. (2000). "Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8490-4.
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J. et Rosenberg, S. A. (1994). "Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Res* **54**(7): 1766-71.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. et Sachs, A. B. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." *Mol Cell* **2**(1): 135-40.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. et Beach, D. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science* **269**(5228): 1281-4.
- Yajima, N., Yamanaka, R., Mine, T., Tsuchiya, N., Homma, J., Sano, M., Kuramoto, T., Obata, Y., Komatsu, N., Arima, Y., Yamada, A., Shigemori, M., Itoh, K. et Tanaka, R. (2005). "Immunologic evaluation of personalized peptide vaccination for patients with advanced malignant glioma." *Clin Cancer Res* **11**(16): 5900-11.
- Yamaguchi, Y., Ohta, K., Kawabuchi, Y., Ohshita, A., Okita, R., Okawaki, M., Hironaka, K., Matsuura, K. et Toge, T. (2005). "Feasibility study of adoptive immunotherapy for metastatic lung tumors using peptide-pulsed dendritic cell-activated killer (PDAK) cells." *Anticancer Res* **25**(3c): 2407-15.
- Yamanaka, R., Abe, T., Yajima, N., Tsuchiya, N., Homma, J., Kobayashi, T., Narita, M., Takahashi, M. et Tanaka, R. (2003). "Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial." *Br J Cancer* **89**(7): 1172-9.
- Yang, S., Vervaert, C. E., Burch, J., Jr., Grichnik, J., Seigler, H. F. et Darrow, T. L. (1999). "Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity." *Int J Cancer* **83**(4): 532-40.
- Yang, Y., Ertl, H. C. et Wilson, J. M. (1994). "MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses." *Immunity* **1**(5): 433-42.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E. et Wilson, J. M. (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4407-11.
- Yu, J. S., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L. et Wheeler, C. J. (2004). "Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma." *Cancer Res* **64**(14): 4973-9.
- Yu, W., Pirollo, K. F., Yu, B., Rait, A., Xiang, L., Huang, W., Zhou, Q., Ertem, G. et Chang, E. H. (2004). "Enhanced transfection efficiency of a systemically delivered tumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitive histidylated oligolysine peptide." *Nucleic Acids Res* **32**(5): e48.
- Zeis, M., Siegel, S., Wagner, A., Schmitz, M., Marget, M., Kuhl-Burmeister, R., Adamzik, I., Kabelitz, D., Dreger, P., Schmitz, N. et Heiser, A. (2003). "Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells." *J Immunol* **170**(11): 5391-7.
- Zhang, S., Williams, C. J., Hagan, K. et Peltz, S. W. (1999). "Mutations in VPS16 and MRT1 stabilize mRNAs by activating an inhibitor of the decapping enzyme." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7568-76.
- Zhang, Y., Harada, A., Wang, J. B., Zhang, Y. Y., Hashimoto, S., Naito, M. et Matsushima, K. (1998). "Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit+ bone marrow hematopoietic progenitor cells." *Blood* **92**(1): 118-28.
- Zhang, Y., Zhang, Y. Y., Ogata, M., Chen, P., Harada, A., Hashimoto, S. et Matsushima, K. (1999). "Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate

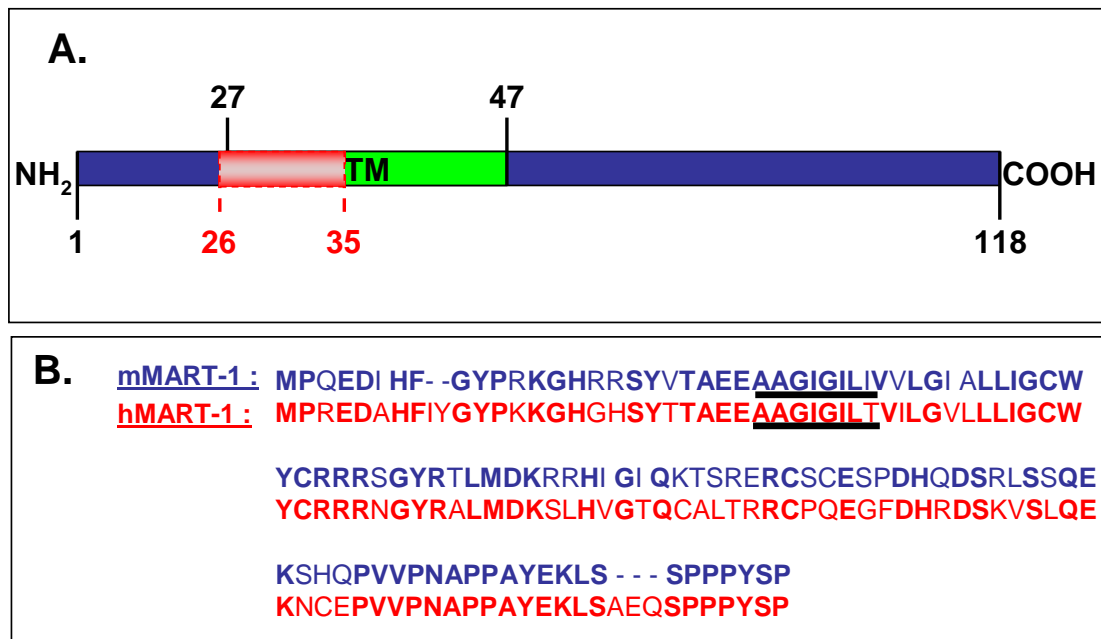
- Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway." Blood **93**(4): 1208-20.
- Zhong, L., Granelli-Piperno, A., Choi, Y. et Steinman, R. M. (1999). "Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells." Eur J Immunol **29**(3): 964-72.
- Zhou, W. Z., Hoon, D. S., Huang, S. K., Fujii, S., Hashimoto, K., Morishita, R. et Kaneda, Y. (1999). "RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization." Hum Gene Ther **10**(16): 2719-24.
- Zhou, X. H., Klibanov, A. L. et Huang, L. (1991). "Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1065**(1): 8-14.
- Zitvogel, L. (2002). "Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity." J Exp Med **195**(3): F9-14.
- Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R., Lotze, M. T. et Storkus, W. J. (1996). "Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines." J Exp Med **183**(1): 87-97.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. et Amigorena, S. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.

## **ANNEXES**



## ANNEXE 1 :

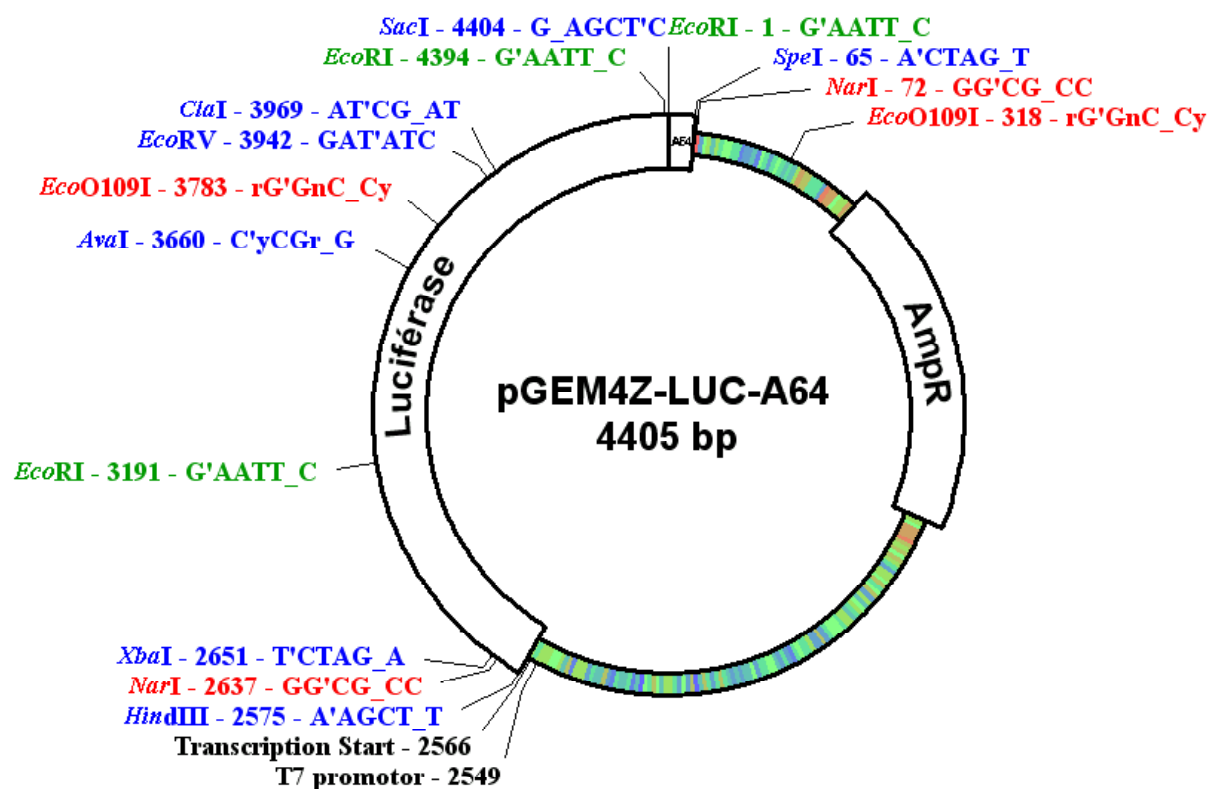
Séquence et épitopes immunodominants de l'antigène MelanA/MART1 chez l'homme et la souris.



**La protéine MelanA/MART-1 :** MelanA/MART-1 est une protéine transmembranaire de type III de 118 acides aminés et de 13 kDa (**A**). Elle se localise principalement au niveau du réticulum endoplasmique et du réseau transgolgien du mélanocyte. La comparaison des séquences protéiques chez l'homme (*hMART-1*) et la souris (*mMART-1*) montre une identité de séquence de 69% et un épitope immunodominant (résidus 26 à 35) qui se situe essentiellement dans la partie transmembranaire (TM) et ne varie que d'un acide aminé entre les deux espèces (**B**).

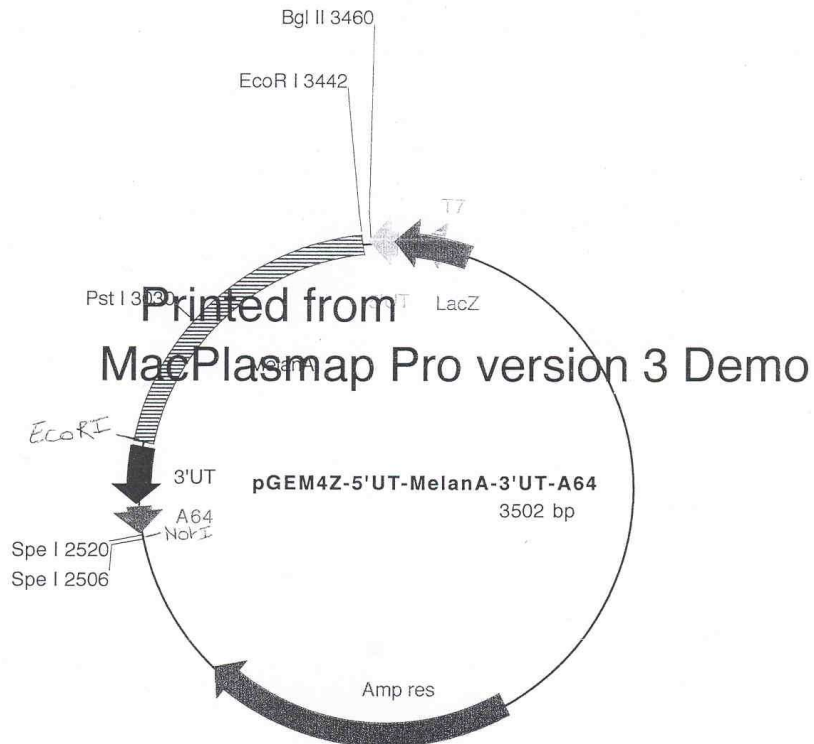
## ANNEXE 2 :

### Carte du plasmide pGEM-4Z/LUC/A64



## **ANNEXE 3 :**

### **Carte du plasmide pGEM-4Z/MART1/A64**



### **Carte du plasmide pGEM-4Z/sig-MART1-LAMP1/A64**

