HAL
open science

# Utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Tn en immunothérapie des cancers

Adèle Heitzmann Heitzmann-Daverton

## To cite this version:

Adèle Heitzmann Heitzmann-Daverton. Utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Tn en immunothérapie des cancers. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T014 . tel-00923181

**HAL Id: tel-00923181**

**https://theses.hal.science/tel-00923181v1**

Submitted on 2 Jan 2014

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT
# DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5 - RENÉ DESCARTES

École Doctorale Gc2iD - ED 157

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par
**Adèle HEITZMANN-DAVERTON**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 5

Sujet de la thèse :

# Utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Tn en immunothérapie des cancers

**Soutenue le 28 Juin 2013**
à l'Institut Curie, Paris

Devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Monsieur le Docteur Sebastian AMIGORENA (DR) | Directeur de thèse |
| Madame le Professeur Mireille VIGUIER | Présidente du jury |
| Madame le Professeur Claude LECLERC | Rapporteur |
| Monsieur le Docteur Pierre BRUHNS (DR) | Rapporteur |
| Madame le Docteur Nathalie CHAPUT-GRAS | Examinateur |

*A mon mari David*

*A mes parents*

# REMERCIEMENTS

*Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Curie, au sein du laboratoire « Immunité et Cancer » (Inserm U932) dirigé par Monsieur le Docteur Sebastian AMIGORENA.*

*Je souhaiterai tout d'abord remercier les membres du jury, qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail, et notamment la présidente de ce jury, Madame le Docteur Mireille VIGUIER.*
*Je remercie plus particulièrement Madame le Docteur Claude LECLERC et Monsieur le Docteur Pierre BRUHNS qui ont accepté la tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit.*
*Un grand merci également à Madame le Docteur Nathalie CHAPUT-GRAS pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant qu'examinatrice.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite à Sebastian AMIGORENA, directeur de l'Unité Inserm U932, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse.*
*Je remercie également Pascale HUBERT et Christine SEDLIK, qui m'ont accueillie au sein de leur équipe et m'ont guidée tout au long de mon projet de thèse. Pascale, je te remercie car c'est avec toi que j'ai effectué mes premiers pas dans le monde de la recherche, sous ton œil attentif et rigoureux. C'est avec toi que j'aurai publié mon premier article scientifique. Christine, merci d'avoir accepté de m'encadrer suite au départ de Pascale et d'avoir repris la suite du projet Tn.*
*Merci aussi à Sophie VIEL, Assistante Ingénieur de notre équipe Tn, pour son aide, et pour avoir pris soin de mes cultures cellulaires et de mes souris.*

*Merci également à Claire HIVROZ pour avoir accepté d'être ma tutrice de thèse, pour son écoute et ses conseils.*

*Je remercie également l'équipe de Frédéric SCHMIDT du laboratoire de "Conception, Synthèse et Vectorisation de Biomolécules" (UMR 176, Institut Curie) dirigé par Monsieur Jean-Claude FLORENT, pour avoir accepté de collaborer avec nous dans le couplage de notre anticorps à des molécules chimiques. Un grand merci à Rafik AIT-SARKOUH qui a réalisé lui-même tous les*

*couplages avec succès, pour sa grande gentillesse, son professionnalisme, et sa détermination à résoudre les problèmes.*

*J'adresse un clin d'œil à tous mes collègues de bureau « pièce 440 » : Sophie VIEL, Caroline CHESNEAU, Jordan DENIZEAU, Philippe DE LA ROCHERE et Hélène DURET, pour leur bonne humeur et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Caroline, tu auras été ma grande confidente, toujours là pour me remonter le moral, écouter mes aventures campagnardes du week-end... et ton départ pour Servier a laissé un grand vide au laboratoire. Jordan, merci pour ton énergie débordante, ta bonne humeur et ta gentillesse. Reste comme tu es, on t'adore. Philippe, tu es fort urbain (« du nom d'un Pape... »), toujours désagréable, mais on s'habitue... Je me rappelle encore la première fois que je t'ai rencontré au labo, tu étais d'une humeur massacrante !*

*Une petite dédicace également à mes collègues de l'équipe Lantz : Héloïse FLAMENT, Virginie PREMEL, Delphine LOUIS... et toutes les personnes de notre étage, qui chacune apporte sa contribution à l'ambiance générale. Virginie et Héloïse, vous avez toujours été à l'écoute lors de mes petites baisses de moral, et je vous en remercie.*

*J'adresse un très grand merci à ma famille, et tout particulièrement à mes parents, pour m'avoir soutenue et encouragée pendant ces longues années d'études, avec les hauts et les bas inévitables ponctuant toute thèse. Je serai maintenant Docteur, comme papa !*

*J'adresse enfin un IMMENSE MERCI à mon mari, David, car supporter sa femme en thèse, ses multiples questionnements, ses doutes, ses baisses de moral, son mauvais caractère... n'est pas toujours facile au quotidien... En tous cas, cela ne t'a pas empêché de me demander en mariage et de nous unir le 1er Septembre 2012 ! Alors merci d'avoir toujours été là pour moi.*

# RESUME

La transformation des cellules normales de l'organisme en un phénotype malin est souvent accompagnée de changements dans leur antigénicité. L'antigène Tn (GalNac-*O*-Ser/Thréo) est un antigène (Ag) glycopeptidique spécifique des tumeurs et exprimé à la membrane plasmique des cellules cancéreuses dans la majorité des carcinomes humains ainsi que dans certaines tumeurs hématologiques, tandis qu'il n'est pas détecté dans les cellules normales. Il représente donc une cible potentielle très intéressante pour l'immunothérapie passive par anticorps, car il n'est pas détectable dans les cellules normales, mais est démasqué dans environ 90% des cancers épithéliaux du fait d'une dérégulation des processus de glycosylation.
Les anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques d'antigènes exprimés à la membrane des cellules tumorales ont une efficacité prouvée dans le traitement de certains cancers. Ces AcM thérapeutiques sont particulièrement intéressants pour le traitement des cancers du fait de leur forte spécificité pour les cellules tumorales et de leur faible toxicité pour les cellules normales, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, mais leur mécanisme d'action est encore mal connu. L'AcM Chi-Tn est un anticorps chimérique homme/souris capable de se fixer de façon spécifique à l'antigène tumoral Tn, alors qu'il ne se fixe pas sur les cellules normales. Cet AcM pourrait donc être envisagé comme agent thérapeutique dans le traitement des cancers épithéliaux par immunothérapie passive.

Nous nous sommes intéressés à l'AcM Chi-Tn non couplé en vue d'analyser son mécanisme d'action et d'évaluer son efficacité thérapeutique *in vivo*. Nous avons montré que l'AcM Chi-Tn seul ne possède pas d'effet toxique direct sur les lignées de cellules tumorales Tn-positives *in vitro*. Cependant, en présence de macrophages, cet AcM est capable d'induire la lyse de ces cellules par un mécanisme d'ADCC. *In vivo*, l'AcM Chi-Tn, associé à la cyclophosphamide, induit le rejet d'une tumeur du sein dans plus de 80% des souris. Cette inhibition de la croissance tumorale est abolie chez les souris déficientes pour la chaine γ associée aux récepteurs RFcγ activateurs, suggérant *in vivo* un mécanisme d'ADCC. Par l'étude microscopique du microenvironnement tumoral, nous avons observé que les cellules tumorales forment *in vivo* des synapses avec des macrophages, des neutrophiles, mais aussi des lymphocytes B. Des expériences de survie *in vivo* chez des souris déficientes pour différentes populations cellulaires montrent que les lymphocytes T semblent nécessaires à la protection des souris par Chi-Tn contre la tumeur. Ainsi, ces résultats confirment le rôle des effecteurs exprimant des RFcγ activateurs, mais aussi le rôle indispensable de la réponse immune adaptative pour assurer l'effet thérapeutique des AcM.
Nous nous sommes également intéressés à l'utilisation potentielle de l'AcM Chi-Tn comme vecteur d'agents cytotoxiques. *In vivo*, dans un modèle de tumeurs solides chez la souris, des expériences de biodistribution montrent que l'AcM Chi-Tn est capable de cibler spécifiquement les zones tumorales, ce qui en fait un anticorps potentiellement utilisable comme vecteur de molécules toxiques. L'internalisation du complexe anticorps/antigène cible est un pré-requis nécessaire à l'utilisation de l'anticorps conjugué. Nous avons montré *in vitro* que l'AcM Chi-Tn est internalisé dans les endosomes précoces et de recyclage pendant un temps relativement long, faisant de cet AcM un bon candidat pour être couplé à des agents cytotoxiques. Durant ma thèse, nous avons couplé l'AcM Chi-Tn à la toxine saporine ou à la molécule cytotoxique auristatine F, et nous avons montré *in vitro* que ces conjugués sont cytotoxiques sur des lignées cellulaires Tn-positives.

**Mots clés :**
Anticorps monoclonal, immunothérapie, internalisation, immunoconjugué, saporine, auristatine F.

# SOMMAIRE

**REMERCIEMENTS** ..... **3**

**RESUME** ..... **5**

**SOMMAIRE** ..... **6**

**LISTE DES ABBREVIATIONS** ..... **9**

**AVANT-PROPOS** ..... **15**

**INTRODUCTION** ..... **17**

**I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE EN CANCEROLOGIE** ..... **17**

A. LES CELLULES TUMORALES ..... 18

B. LES ANTIGENES SPECIFIQUES DES TUMEURS ..... 18

*1. Les différents types d'antigènes associés aux tumeurs* ..... *19*

*2. L'antigène tumoral Tn* ..... *20*

C. LES DEFENSES DU SYSTEME IMMUNITAIRE CONTRE LES CELLULES CANCEREUSES ..... 24

D. LES MECANISMES D'ECHAPPEMENT DES CELLULES TUMORALES AU SYSTEME IMMUNITAIRE ..... 27

**II. LES TRAITEMENTS ACTUELS CONTRE LE CANCER** ..... **29**

A. LES TRAITEMENTS DE ROUTINE ..... 30

*1. La chirurgie* ..... *30*

*2. La chimiothérapie* ..... *30*

*3. La radiothérapie* ..... *31*

*4. L'hormonothérapie* ..... *32*

*5. Les thérapies ciblées* ..... *32*

B. L'IMMUNOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS ..... 33

*1. L'immunothérapie active* ..... *33*

*2. L'immunothérapie adoptive* ..... *34*

*3. L'immunothérapie passive* ..... *36*

**III. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES** ..... **36**

A. LES ANTICORPS ET LES RECEPTEURS FC ..... 36

*1. Structure des anticorps* ..... *37*

*2. Les différentes classes d'immunoglobulines* ..... *37*

*3. Les fonctions effectrices médiées par les anticorps* ..... *39*

*4. Les récepteurs Fc* ..... *40*

a) Les récepteurs FcγR humains ..... 41

b) Les récepteurs FcγR murins ..... 42
B. LES ANTICORPS MONOCLONAUX A USAGE THERAPEUTIQUE ..... 43
*1. Production d'anticorps monoclonaux ..... 43*
*2. Quelques exemples emblématiques d'anticorps monoclonaux ..... 45*
*3. Les anticorps recombinants ..... 46*
*4. Les récentes avancées avec les anticorps immunomodulateurs ..... 48*
*5. Caractéristiques de l'antigène cible et de l'AcM ..... 49*
C. LES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-TN ..... 49
D. L'ANTICORPS MONOCLONAL CHIMERIQUE ANTI-TN « CHI-TN » ..... 50
**IV. LES MECANISMES D'ACTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX ..... 52**
A. EFFET DIRECT ..... 52
B. OPSONISATION ..... 53
C. ADCC : ANTIBODY-DEPENDENT CELL CYTOTOXICITY ..... 54
D. CDC : COMPLEMENT-DEPENDENT CYTOTOXICITY ..... 55
**V. LES ANTICORPS COUPLES COMME VECTEURS CYTOTOXIQUES SPECIFIQUES ..... 56**
A. LES ANTICORPS COUPLES A UN ELEMENT RADIOACTIF : LES RADIO-IMMUNOCONJUGUES ..... 57
*1. Couplage direct à un élément radioactif ..... 57*
*2. Technique de « pré-targeting » ..... 58*
B. LES ANTICORPS COUPLES A UNE MOLECULE TOXIQUE ..... 58
*1. Les linkers utilisés ..... 60*
*2. Quelques exemples de molécules toxiques utilisées ..... 61*
a) La calicheamycine ..... 61
b) Les camptothécines ..... 62
c) Les maytansinoides ..... 62
d) Les auristatines ..... 63
C. LES ANTICORPS COUPLES A UNE TOXINE : LES IMMUNOTOXINES ..... 64
D. LES ANTICORPS COUPLES A UNE CYTOKINE : LES IMMUNOCYTOKINES ..... 65
E. COMBINAISON DE THERAPIES ..... 65
**RESULTATS EXPERIMENTAUX ..... 66**
**I. ACTIVITE ANTITUMORALE DE L'ANTICORPS CHI-TN ET MECANISMES D'ACTION ..... 68**
A. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 1 ..... 68
B. ARTICLE 1 ..... 71
C. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES ..... 108
**II. L'ANTICORPS CHI-TN COMME VECTEUR D'AGENTS CYTOTOXIQUES ..... 111**
A. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE 2 ..... 111
B. ARTICLE 2 ..... 114

**DISCUSSION ET PERSPECTIVES** ..... **142**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... **159**

# LISTE DES ABBREVIATIONS

**AcM : A**nti**c**orps **M**onoclonal

**ADC :** ***A****ntibody-****D****rug* ***C****onjugate* (conjugué anticorps-molécule toxique)

**ADCC :** ***A****ntibody* ***D****ependent* ***C****ell-mediated* ***C****ytotoxicity* (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)

**ADN : A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique

**ALCL :** ***A****naplastic* ***L****arge* ***C****ell* ***L****ymphoma* (lymphome systémique anaplasique à grandes cellules)

**ALL :** ***A****cute* ***L****ymphoblastic* ***L****eukemia* (leucémie lymphoblastique aigue à cellules B)

**AML :** ***A****cute* ***M****yeloid* ***L****eukemia* (leucémie myéloïde aigüe)

**Apaf-1:** *Apoptotic* ***p****eptidase* ***a****ctivating* ***f****actor* ***1***

**ARN: A**cide **R**ibo**N**ucléique

**Asn:** Acide aminé **As**paragi**n**e

**Bak :** ***B****cl2 homologous* ***a****ntagonist* ***k****iller*

**Bax :** ***B****cl2-****a****ssociated* ***x*** *protein*

**BCG : B**acille de **C**almette et **G**uérin

**Bcl-2 :** ***B****-****c****ell* ***l****eukemia protein-****2***

**Bcl-xl :** ***B****-****c****ell* ***l****eukemia* ***e****xtra* ***l****arge*

**BCR :** ***B****-****C****ell* ***R****eceptor* (récepteurs d'antigènes de lymphocytes B)

**Biot : Biot**ine (vitamine $B_8$ ou H)

***BRCA1, BRCA2 : BR****east* ***CA****ncer 1, 2* (gènes touchés par des mutations dans le cas de certains cancers du sein)

**BSA :** ***B****ovin* ***S****erum* ***A****lbumin* (albumine de sérum bovin)

**bsAb : bis**pécific **Anti**body (anticorps bispécifique)

**Caspase :** ***C****ystéin-****asp****aratic acid prote****ase*** (protéase intracellulaire à cystéine, enzyme protéolytique)

**CD :** ***C****lusters of* ***D****ifferenciation* (groupes de différenciation, protéines de surface)

**CDC :** ***C****omplement-****D****ependent* ***C****ytotoxicity* (cytotoxicité dépendante du complément)

**CDR :** ***C****omplementary-****D****etermining* ***R****egions* (régions déterminant la complémentarité)

**CEA :** ***C****arcino****e****mbrionic* ***A****ntigen* (antigène carcinoembryonnaire)

**c-FLIP : c***ellular* ***F****LICE-****L****ike* ***I****nhibitory* ***P****rotein*

**CFSE :** ***C****arboxy****F****luorescein* ***S****uccinimidyl* ***E****ster*

**CH :** ***C****onstant* ***H****eavy region* (région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines)

**Chi-Tn :** Anticorps monoclonal **chi**mérique anti-**Tn**

**CL :** ***C****onstant* ***L****ight region* (région constante de la chaîne légère des immunoglobulines)

**CLL :** ***C****hronic* ***L****ymphocytic* ***L****eukemia* (leucémie lymphocytaire chronique)

**CMH :** **C**omplexe **M**ajeur d'**H**istocompatibilité

**Cosmc :** ***C****ore 1 β3galactosyltransferase-****s****pecific* ***m****olecular* ***c****haperone*

**CPA :** **C**ellule **P**résentatrice d'**A**ntigène

**CR :** ***C****omplement* ***R****eceptor* (récepteur du complément)

**CT :** Sous-unité B de la **C**holéra-**T**oxine (*Vibrio cholerae*)

**CTCL :** ***C****utaneous* ***T****-****C****ell* ***L****ymphoma* (lymphome cutané à cellules T)

**CTLA-4 :** ***C****ytotoxic* ***T****-****L****ymphocyte* ***A****ntigen* **4** (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique, CD152)

**CTX :** **C**yclophosphamide

**Cy3 :** Fluorochrome **Cy**anine **3**

**Cy5 :** Fluorochrome **Cy**anine **5**

**DAPI :** 4',6' **D**i **A**midino-2-**P**hényl **I**ndole

**DC :** ***D****endritic* ***C****ell* (cellule dendritique)

**DM1 :** N2′-deacetyl-N2′-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine

**EDTA :** ***E****thylene* ***D****iamine* ***T****etr****A****cetate* (acide éthylène-diamine-tétra-acétique)

**EGF :** ***E****pidermal* ***G****rowth* ***F****actor* (facteur de croissance épidermique)

**EGFR :** ***E****pidermal* ***G****rowth* ***F****actor* ***R****eceptor* (récepteur du facteur de croissance épidermique)

**EMA :** ***E****uropean* ***M****edicines* ***A****gency* (Agence Européenne des Médicaments)

**ERC :** ***E****ndocytic* ***R****ecycling* ***C****ompartments* (endosome de recyclage)

**E/T ratio :** ***E****ffector cell to* ***T****arget cell* ***ratio*** (ratio effecteur / cible)

Fab **:** ***F****ragment* ***a****ntigen* ***b****inding* (fragment de liaison à l'antigène)

**FACS :** ***F****luorescent-****A****ctivated* ***C****ell* ***S****orter* (trieur de cellules par fluorescence, cytométrie de flux)

**Fas/APO-1 :** ***APO****ptosis antigen* ***1*** (CD75)

**Fc :** **F**ragment **c**ristallisable d'une immunoglobuline

**FCS:** ***F****etal* ***C****alf* ***S****erum* (sérum de veau foetal)

**FDA :** *US* ***F****ood and* ***D****rug* ***A****dministration*

**FGF :** ***F****ibroblast* ***G****rowth* ***F****actor* (facteur de croissance)

**FITC :** ***F****luorescein* ***I****so****T****hio****C****yanate* (isothiocyanate de fluorescéine)

**g : g**ramme

**GαH :** ***G****oat* ***a****nti-****H****uman* (sérum de chèvre anti-IgG humaine)

**GαM :** ***G****oat* ***a****nti-****M****ouse* (sérum de chèvre anti-IgG murine)

**GαR :** ***G****oat* ***a****nti-****R****at* (sérum de chèvre anti-IgG de rat)

**GalNac : N-ac**étyl-**Gal**actosamine

**GD3 : G**anglioside **D3**

**GFP :** ***G****reen* ***F****luorescent* ***P****rotein* (protéine fluorescente verte)

**GlcNac : N-ac**étyl-D-**Gluc**osamine

**GM-CSF :** ***G****ranulocyte-****M****acrophage* ***C****olony-****S****timulating* ***F****actor* (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages)

**gp : g**lyco**p**rotéine

**GPI : G**lycosyl **P**hosphatidyl **I**nositol

**HACA :** ***H****uman* ***A****nti-****C****himeric* ***A****ntibodies* (anticorps humains anti-anticorps chimériques)

**HAMA :** ***H****uman* ***A****nti-****M****ouse* ***A****ntibodies* (anticorps humains anti-anticorps de souris)

**HBV :** ***H****epatitis* ***B*** ***V****irus* (virus de l'hépatite B)

**HCV :** ***H****epatitis* ***C*** ***V****irus* (virus de l'hépatite C)

**Her : Her**ceptine (Trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-HER-2)

**HER-2 :** ***H****uman* ***E****GF* ***R****eceptor* ***2*** (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

**HL :** ***H****odgking* ***L****ymphoma* (lymphome de Hodgking)

**HMGB :** ***H****igh* ***M****obility* ***G****roup* ***B****ox*

**HPA :** Lectine animale, agglutinine de ***H****elix* ***pomati****a*

**HPV :** ***H****uman* ***P****apillomaVirus* (papillomavirus humain)

**HSP :** ***H****eat-****S****hock* ***P****roteins* (protéines de choc thermique)

**IAP :** ***I****nhibitor of* ***A****poptosis* ***P****rotein*

**IC50 :** *half maximal* ***I****nhibitory* ***C****oncentration* ***50%*** (concentration inhibitrice médiane)

**ICD:** ***I****mmunogenic* ***C****ell* ***D****eath* (mort cellulaire immunogène)

**IF : I**mmuno**F**luorescence

**IFN : I**nter**F**éro**N** (cytokine)

**Ig :** ***I****mmuno****g****lobulin* (immunoglobuline)

**IHC : I**mmuno**H**isto**C**himie

**IL : I**nter**L**eukine (cytokine)

**ip :** ***i****ntra-****p****eritoneal* (injection intra-péritonéale)

**ITAM :** ***I****mmunoreceptor* ***T****yrosine-based* ***A****ctivation* ***M****otifs* (motifs activateurs dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs)

**ITIM :** ***I****mmunoreceptor* ***T****yrosine-based* ***I****nhibitory* ***M****otifs* (motifs inhibiteurs dépendant de la tyrosine des immunorécepteurs)

**IUIS :** ***I****nternational* ***U****nion of* ***I****mmunological* ***S****ocieties* (Union internationale des sociétés d'immunologie)

**iv :** ***i****ntra-****v****enous* (injection intraveineuse)

**IvIg :** ***I****ntra****v****enous* ***I****mmuno****g****lobulin* (immunoglobuline intraveineuse)

**kDa : K**ilo**Da**lton (unité de poids moléculaire)

**L : L**itre

**LAL : L**eucémie **A**igüe **L**ymphoblastique

**LAMP-1 :** ***L****ysosomal-****A****ssociated* ***M****embrane* ***P****rotein* ***1*** (protéine membranaire 1 associée aux lysosomes)

**LEC :** ***L****ymphatic* ***E****ndothelial* ***C****ell* (cellule endothéliale lymphatique)

**LMC : L**eucémie **M**yéloïde **C**hronique

**LTc :** ***L****ymphocyte* ***T c****ytotoxique*

**M :** Molaire (mol/L)

**MAC :** ***M****embrane* ***A****ttack* ***C****omplex* (complexe d'attaque membranaire)

**MAG :** ***M****ultiple* ***A****ntigenic* ***G****lycopeptide*

**MAGE :** ***M****elanoma* ***A****nti****GE****ne* (anitgène de mélanome)

**MART-1:** ***M****elanoma* ***A****ntigen* ***R****ecognized by* ***T*** *lymphocytes****-1*** (antigène du mélanome reconnu par les lymphocytes T)

**mc :** Groupement **m**aleimido**c**aproyl

**MDSC :** ***M****yeloid* ***D****erived* ***S****uppressor* ***C****ell* (cellule myéloïde suppressive)

**MGL :** ***M****acrophage* ***G****alactose-type* ***L****ectin*

**MIF : M**oyenne d'**I**ntensité de **F**luorescence, déterminée par cytométrie de flux

**MMAE : M**onométhyl **A**uristatine **E**

**MMAF : M**onométhyl **A**uristatine **F**

**MOI :** ***M****ultiplicity* ***Of*** ***I****nfection* (multiplicité d'infection)

**MUC-1 : MUC**ine**-1**

**NHL :** ***N****on-****H****odgking* ***L****ymphoma* (lymphome non-Hodgkinien)

**NK :** ***N****atural* ***K****iller Cell* (cellules tueuses naturelles)

**OSM :** ***O****vine* ***S****ubmaxillar* ***M****ucin* (mucine submaxillaire ovine)

**OvCar :** ***Ov****arian* ***Car****cinoma* (lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome ovarien humain)

**PAP :** ***P****rostatic* ***A****cid* ***P****hosphatase* (phosphatase acide prostatique)

**PBMC :** ***P****eripheral* ***B****lood* ***M****ononuclear* ***C****ell* (cellule mononucléaire du sang périphérique)

**PBS :** ***P****hosphate* ***B****uffer* ***S****aline* (tampon phosphate salin, tampon isotonique)

**PD-1 :** ***P****rogrammed* ***D****eath****-1*** (protéine de mort programmée 1)

**PD-L1 :** ***P****rogrammed* ***D****eath* ***L****igand****-1*** (ligand de la protéine de mort programmée 1)

**PE :** Fluorochrome **P**hyco**E**rythrine

**PerCP : *Per*idinin *C*hlorophyll *P*rotein *complex*** (protéine de peridinine-chlorophylle)

**PFA : P**ara**F**orm**A**ldéhyde

**PGE2 : *P*rosta*G*landin *E2*** (prostaglandine E2)

**Phal : Phal**loidine

PhM **: *Ph*osphoramide *M*ustard** (moutarde phosphoramide)

**RAG : *R*ecombination- *A*ctivating *G*enes** (gènes activateurs de recombinaison)

**RAIT : Ra**dio-**I**mmuno**T**hérapie

**RE : R**éticulum **E**ndoplasmique

**RFc : R**écepteur aux **F**ragments **c**onstants des immunoglobulines

**RFcγ : R**écepteur aux **F**ragments **c**onstants des immunoglobulines IgG

**RIP : *R*ibosome *I*nactivating *P*rotein** (protéine inactivant les ribosomes)

**rpm : R**otations **p**ar **m**inute

**RPMI : *R*oswell *P*ark *M*emorial *I*nstitute medium** (milieu de culture cellulaire)

**RTX : Rit**u**x**imab (Rituxan®, MabThera®, anticorps monoclonal chimérique anti-CD20)

**Sa : S**trept**a**vidine (issue de *Streptomyces avidinii*)

**SAP : *SAP*orin** (saporine)

**sc : *s*ub-*c*utaneous** (injection sous-cutanée)

**ScFv : *S*ingle-*c*hain *v*ariable *F*ragments** (fragments variables simple chaîne)

**SDS-PAGE : *S*odium *D*odécyl*S*ulfate - *P*olyA*c*rylamid *G*el *E*lectrophoresis**

**Ser :** Acide aminé **Sér**ine

**SMAC : *S*upra-*M*olecular *A*ctivation *C*luster** (cluster d'activation supra-moléculaire)

**SPR : *S*urface *P*lasmon *R*esonance** (résonnance plasmonique de surface)

**SVF : S**érum de **V**eau **F**œtal

**TAA : *T*umor-*A*ssociated *A*ntigen** (antigène spécifique des cellules tumorales)

**TACA : *T*umor-*A*ssociated *C*arbohydrate *A*ntigen** (antigène carbohydrate spécifique des cellules tumorales)

**TAP : *T*ransporter associated with *A*ntigen *P*rocessing** (transporteur associé à l'apprêtage des antigènes)

**TCR : *T*-*C*ell *R*eceptor** (récepteur d'antigènes des cellules T)

**Tf : *T*rans*f*errin** (transferrine)

**Tf-R : *T*rans*f*errin-*R*eceptor** (récepteur de la transferrine)

**TGF : *T*ransforming *G*rowth *F*actor** (facteur de croissance transformant)

**Thr :** Acide aminé **Thr**éonine

**TIL : *T*umor *I*nfitrating *L*ymphocytes** (lymphocytes infiltrant les tumeurs)

**TIM :** ***T****-cell* ***I****mmunoglobulin and* ***M****ucin*

**TLR:** ***T****oll* ***L****ike* ***R****eceptor* (récepteur de type Toll)

**Tn:** Antigène **Tn** (GalNac-*O*-Ser/Thréo, CD175)

**TNF :** ***T****umor* ***N****ecrosis* ***F****actor* (facteur de nécrose tumorale)

**TRAIL :** ***T****NF-****R****elated* ***A****poptosis-****I****nducing* ***L****igand* (ligand lié au TNF induisant l'apoptose)

**Treg :** ***reg****ulatory* ***T*** *cell* (lymphocytes T régulateurs)

**Val-Cit :** ***Val****ine-****Cit****ruline linker* (espaceur valine-citruline)

**VEGF :** *Vascular* ***E****ndothelial* ***G****rowth* ***F****actor* (facteur de croissance)

**VH :** *Variable* ***H****eavy region* (domaine variable de la chaîne lourde des immunoglobulines)

**VL :** *Variable* ***L****ight region* (domaine variable de la chaîne légère des immunoglobulines)

**VVA-B4** : Isolectine végétale **B4** de l'agglutinine ***V****icia* ***v****illos****a***

**WGA :** ***W****heat* ***G****erm* ***A****gglutinin* (agglutinine du germe de blé)

**WT :** ***W****ild* ***T****ype* (type sauvage)

# AVANT-PROPOS

Les anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques d'antigènes (Ag) exprimés à la membrane des cellules tumorales suscitent actuellement un intérêt croissant et un développement intensif, et ont une efficacité prouvée dans le traitement de certains cancers. Ces AcM thérapeutiques sont particulièrement intéressants pour le traitement des cancers du fait de leur forte spécificité pour les cellules tumorales et de leur faible toxicité pour les cellules normales, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, mais leur mécanisme d'action est encore mal connu. Ils peuvent être utilisés « nus » afin d'inhiber directement la croissance tumorale par un mécanisme d'apoptose et/ou indirectement, en stimulant le système immunitaire. Le mécanisme d'ADCC semble notamment jouer un rôle majeur dans l'immunothérapie des cancers par anticorps. En effet, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, le rejet des tumeurs nécessite la présence de récepteurs Fc activateurs aux IgG (FcγR) fonctionnels, bien que ce phénomène n'ait pas été directement démontré *in vivo* (chez l'homme). Par ailleurs, ces AcM thérapeutiques peuvent également être utilisés en tant qu'immunoconjugués, afin de délivrer spécifiquement une molécule cytotoxique dans les cellules tumorales, sans affecter les tissus sains.
L'AcM Chi-Tn est un anticorps chimérique homme/souris de type IgG1 capable de se fixer de façon spécifique à l'antigène Tn exprimé par les cellules cancéreuses dans la majorité des carcinomes humains ainsi que dans certaines tumeurs hématologiques. En revanche, cet AcM ne se fixe pas sur les cellules normales. Il pourrait donc être envisagé comme agent thérapeutique dans le traitement des cancers épithéliaux par immunothérapie passive.

Mon travail de thèse a porté sur l'utilisation potentielle de l'AcM Chi-Tn en immunothérapie des cancers par anticorps. L'objectif de ce projet de recherche est de d'analyser le mécanisme d'action de l'AcM Chi-Tn, et d'évaluer son efficacité en immunothérapie passive antitumorale ainsi que la potentialité de son utilisation chez l'homme, en tant qu'anticorps « nu » ou en tant qu'anticorps couplé.

Dans l'introduction de ce manuscrit, après un rappel sur la réponse immunitaire en cancérologie et sur les différents traitements actuels contre le cancer, nous nous intéresserons aux anticorps monoclonaux thérapeutiques, à leurs mécanismes d'action et à leur utilisation comme vecteurs de molécules cytotoxiques.

Ensuite seront présentés les résultats obtenus au cours de ma thèse, avec deux parties correspondant aux deux stratégies thérapeutiques développées :

- la première partie portant sur l'utilisation de l'AcM Chi-Tn « nu » dans un modèle préclinique de souris greffées par une lignée de cellules tumorales épithéliales, en vue d'analyser son mécanisme d'action et d'évaluer son efficacité thérapeutique *in vivo*.
- la seconde partie portant sur la vectorisation de l'AcM Chi-Tn en le couplant à des molécules cytotoxiques, telles que la Saporine ou l'Auristatine F, afin de les cibler directement dans la tumeur. Cela permettrait de combiner les effets biologiques de l'AcM Chi-Tn avec l'effet additionnel d'une réponse cytotoxique ciblée.

Enfin, l'ensemble des résultats de thèse seront résumés et discutés dans la partie Discussion.

# INTRODUCTION

## I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE EN CANCEROLOGIE

Les cellules et les médiateurs du système immunitaire interagissent entre eux pour assurer à l'organisme une protection continue contre les agressions (organismes pathogènes, substances, cellules cancéreuses), tout en maintenant une tolérance vis-à-vis du « soi ».
Les vertébrés possèdent deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative, qui fonctionnent en étroite collaboration.

L'immunité innée (ou immunité naturelle) constitue la première ligne de défense non spécifique de l'organisme et fait intervenir les barrières physiques et chimiques que constituent la peau et les muqueuses (larmes, le mucus, la salive, la sueur, les urines, le sébum, le suc gastrique, les sécrétions vaginales...), une composante cellulaire (cellules NK, granulocytes neutrophiles et macrophages) ainsi qu'une composante humorale (le système du complément).

La réponse immunitaire innée est suivie d'une réponse immunitaire adaptative (ou spécifique) qui s'établit plus lentement, mais induit une protection beaucoup plus spécifique. Les cellules de la réaction adaptative (lymphocytes T et lymphocytes B), expriment un large répertoire de récepteurs spécifiques d'antigène, ce qui permet de reconnaitre spécifiquement des milliards de structures différentes.

Deux propriétés distinguent les défenses adaptatives des défenses innées :
1) la réaction spécifique à des antigènes définis, ce qui suppose le pouvoir de distinguer les molécules du soi et du non-soi. Cette réaction est de plus capable de reconnaitre les cellules infectées ou altérées de l'hôte (cellules cancéreuses).
2) le système immunitaire présente une mémoire immunitaire de la plupart des antigènes déjà rencontrés qui lui confère une immunité durable, lui permettant de réagir plus rapidement et plus efficacement lors d'un contact ultérieur avec l'antigène.

Ainsi, les réponses immunitaires adaptatives présentent quatre caractéristiques : la spécificité, la diversité, la mémoire, et la distinction du soi et du non soi.

## A. Les cellules tumorales

Les tumeurs malignes sont des proliférations cellulaires anormales, éventuellement capables de se disséminer dans l'organisme (métastases).

En culture *in vitro*, les cellules cancéreuses possèdent des caractéristiques biologiques qui les distinguent des cellules normales homologues :

- Potentiel de réplication illimité : En présence d'un milieu nutritionnel adéquat, les cellules tumorales sont capables de croître indéfiniment (immortalité).
- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs, perte de l'inhibition de contact : La prolifération des cellules tumorales ne s'arrête pas suite au contact avec les cellules voisines. Les cellules malignes continuent de se multiplier pour former des colonies stratifiées.
- Agressivité : Les cellules cancéreuses possèdent un avantage proliferatif, elles détruisent les cellules saines et les remplacent.
- Perte de la dépendance à l'ancrage : Les cellules tumorales peuvent croître en l'absence de support solide pour s'attacher, et possèdent donc une mobilité accrue (invasion métastatique).
- Autonomie de croissance : Les cellules tumorales peuvent proliférer en l'absence de facteurs de croissance.
- Altération de l'antigénicité : Acquisition, perte ou diminution d'expression d'antigènes membranaires (marqueurs tumoraux)
- Altération de la présentation antigénique : Par exemple, perte ou diminution d'expression des molécules de CMH-I observée notamment dans le mélanome, le carcinome colorectal et le cancer du sein.
- Angiogénèse accrue : La tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants dans le tissu sain avoisinant, afin de faciliter sa croissance et sa dissémination vers d'autres organes distants (métastases).

## B. Les antigènes spécifiques des tumeurs

Les cellules tumorales dérivant de cellules normales, leur transformation en un phénotype malin est souvent accompagnée de changements dans leur antigénicité qui permettent alors de les distinguer des cellules normales. Dans le cas idéal, un antigène tumoral est exprimé par la cellule tumorale et

non par les cellules normales, afin d'être reconnu comme étranger par le système immunitaire. Généralement, ces antigènes sont plutôt surexprimés dans les tumeurs mais sont également retrouvés dans des cellules normales en faible quantité.

## 1. Les différents types d'antigènes associés aux tumeurs

L'expression d'antigènes associés aux tumeurs (TAA: *Tumor-Associated Antigens*) peut être provoquée par de multiples mécanismes, incluant des altérations dans le schéma de glycosylation, l'expression de gènes viraux, des translocations chromosomiques, la surexpression d'oncogènes cellulaires… (Gilboa E, 1999; Christiansen J, 2004).

D'après Van Den Eynde BJ. *et al.* (1997), les antigènes spécifiques des tumeurs peuvent être classés en cinq groupes majeurs :

- *Les antigènes tumoraux codés par des gènes habituellement silencieux* dans la plupart des tissus normaux mais activés dans de nombreuses tumeurs de types histologiques variés. On peut par exemple citer le gène *PA1* chez la souris et les gènes *MAGE* et *RAGE* chez l'homme. Les antigènes MAGE, RAGE, BAGE, GAGE et NY-ESO1 sont exprimés sur les cellules cancéreuses, mais également dans les cellules germinales du testicule, alors qu'ils ne sont pas exprimés dans les autres tissus normaux ;
- *Les antigènes de différenciation*, exprimés à la fois dans les cellules normales et cancéreuses. Par exemple, de nombreux lymphocytes T isolés de mélanomes de patients sont capables de reconnaitre l'antigène MART-1/Melan-A exprimé par une majorité de mélanomes, mais aussi par les mélanocytes normaux. On peut citer également la tyrosinase, gp100, gp75, Trp1 et Trp2 ;
- *Les antigènes résultant de mutations*. Ces antigènes sont des peptides présents dans les protéines exprimées par les cellules du soi normales et apparaissant mutés dans les cellules cancéreuses (translocations chromosomiques, mutations ponctuelles...). Par exemple, une mutation affectant le gène humain de la kinase cycline-dépendante (CDK) empêche la protéine qu'il code de se lier à son inhibiteur p16, provoquant une altération de la régulation du cycle cellulaire, et favorisant ainsi la croissance incontrôlée des cellules tumorales. Un nombre important d'antigènes tumoraux résulte de mutations ponctuelles, et plusieurs de ces mutations jouent un rôle dans la transformation et la progression tumorale. On peut citer également β-caténine, CDK4, caspase 8, α-actinine 4 et CDC27 ;
- *Les antigènes surexprimés*. Il s'agit d'antigènes codés par des gènes non mutés, exprimés à la fois dans les tissus sains et les tissus tumoraux, mais surexprimés ou exprimés de manière

aberrante dans ces derniers. C'est par exemple le cas de HER-2/neu, un antigène exprimé dans certains tissus normaux et surexprimé dans 30% des carcinomes mammaires ou ovariens humains. On peut également citer p53 et télomérase ;

- *Les antigènes viraux*, des antigènes dérivés de virus oncogènes. Chez l'homme, le meilleur exemple est celui des oncoprotéines E6 et E7 provenant du papillomavirus humain (HPV-16), qui est à l'origine de la plupart des carcinomes du col de l'utérus. On peut citer également EBV, HBV et HCV.

Chez les patients atteints de cancer, ces différents antigènes tumoraux peuvent être reconnus par des anticorps ou des lymphocytes T, et constituent de ce fait des cibles potentielles pour les stratégies d'immunothérapie anticancéreuse. Cependant, il faut garder à l'esprit que les antigènes spécifiques de tumeurs étant souvent aussi exprimés par les cellules saines, la réponse immunitaire anti-tumorale peut parfois s'accompagner d'une réponse auto-immune la plupart du temps bénigne, mais parfois sévère.

## 2. L'antigène tumoral Tn

Les glycoprotéines présentes à la surface des cellules animales contiennent de nombreuses structures glycaniques. La plupart des liaisons entre les sucres et les acides aminés sont des liaisons de type *N*-glycane (liaison à l'acide aminé Asparagine [Asn]) ou de type *O*-glycane (liaison aux acides aminés Sérine [Ser] et Thréonine [Thr]). La transformation tumorale peut-être associée à des modifications de la structure de ces résidus glycaniques (Brooks S, 2008). Ces glycosylations aberrantes ont leur origine dans un dysfonctionnement des enzymes glycosyltransférases et/ou des glycosidases. Elles se traduisent le plus souvent par un raccourcissement des chaînes glycaniques et par une surexpression de résidus sucrés normalement absents ou discrets dans les cellules saines, faisant apparaître des Ag tumoraux (TACAs, tumor-associated carbohydrate antigens). Ces glycosylations altérées confèrent à la cellule tumorale des propriétés nouvelles contribuant à son phénotype malin, comme par exemple la capacité à s'affranchir des liaisons avec les cellules environnantes, à traverser les parois vasculaires ou à migrer et s'arrimer à des tissus afin de former des métastases. De plus, ces glycosylations altérées peuvent modifier l'immunogénicité des protéines membranaires et leur interaction avec le système immunitaire, notamment avec les cellules présentatrices d'antigènes (Guillot J, 2004; Fuster M, 2005; Napoletano C, 2007). Les TACAs les plus connus sont les antigènes T et Tn, ainsi que leurs formes syalilées ST et STn respectivement.

L'antigène Tn (GalNacα1-*O*-Ser/Thr, Figure 2 ci-dessous), ou CD175, est un antigène de nature glycopeptidique, de structure relativement simple. Il est formé par un résidu N-acétyl-Galactosamine (GalNac) lié par *O*-glycosylation au groupement hydroxyle (liaison α1) des acides aminés Sérine (Ser) ou Thréonine (Thr) présents dans le squelette des protéines de type mucine (Springer GF, 1984, 1995; Guillot F, 2004; Napoletano C, 2007 ; Ju T, 2011).

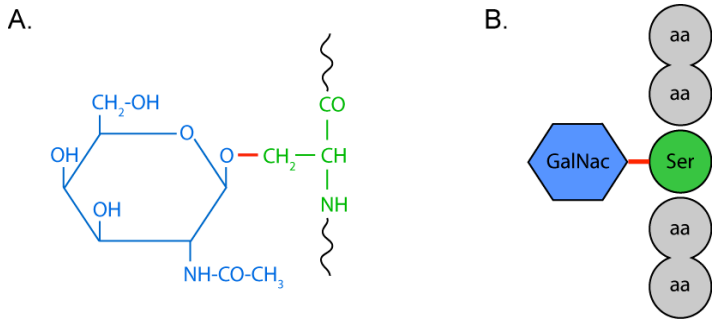



**Figure 1: Structure chimique (A) et représentation schématique (B) de l'antigène Tn**
En bleu : résidu N-acétyl-Galactosamine (GalNac) ; en vert : acide aminé Sérine (Ser) ; en gris/noir : squelette amino-acide (aa) d'une protéine membranaire de type mucine ; en rouge : liaison formée par *O*-glycosylation.

Les mucines sont de volumineuses molécules présentes dans les sécrétions de mucus et à la membrane plasmique des cellules épithéliales (Guillot F, 2004). La mucine 1 (MUC-1) est un exemple de mucine portant l'antigène Tn (Freire T, 2003). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire d'environ 1000 acides aminés, exprimée à la surface apicale de la plupart des cellules épithéliales glandulaires et dont la partie extracellulaire riche en acides aminés Ser et Thr permet un fort taux d'*O*-glycosylation et donc la fixation de nombreux *O*-glycanes tels que l'antigène tumoral Tn (Reis CA, 1998 ; Napoletano C, 2007). De même, des études ont montré que la protéine CD43 présente à la surface des cellules lymphocytaires Jurkat (leucémie à cellules T) était porteuse de l'antigène tumoral Tn (Piller F, 1988).

L'expression de l'antigène Tn dans les cancers épithéliaux chez l'homme et chez l'animal est due à une dérégulation des processus de glycosylation (Springer GF, 1984). Elle correspond à l'absence ou à l'inactivité de la β-3-galactosidotransférase (ou transférase T) au niveau de l'appareil de Golgi, qui synthétise l'antigène T (antigène de Thomsen-Friedenreich, ou CD176) par addition d'un D-galactose lié en β1→3 sur GalNAc-α1-*O*-Ser/Thr (Springer GF, 1984, 1995; Guillot F, 2004). Cela induit une élongation incomplète de la chaîne carbohydrate et amène au démasquage de l'antigène Tn (Freire T, 2005). L'antigène Tn est la forme la plus courte des antigènes O-glycosylés tronqués associés aux tumeurs.

L'équipe de Ju T. (2008) a montré, dans des lignées de cellules tumorales humaines de type Jurkat, que la perte d'activité de cette enzyme transférase T et son incapacité à modifier le précurseur Tn

était due à des mutations dans le gène *Cosmc* localisé sur le chromosome X. Ce gène code pour la protéine chaperone Cosmc, localisée dans le réticulum endoplasmique, et nécessaire à la formation de la transférase T active *in vivo*.

Différentes approches ont pu être utilisées afin de détecter l'antigène Tn à la surface des cellules tumorales. Ces approches possèdent chacune leurs avantages et leurs limites, et peuvent être divisées en trois grandes catégories : approche chimique, basée sur les lectines, ou basée sur les anticorps. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux dernières, les plus courantes, utilisées avec des techniques d'immunohistochimie ou de Western Blot.

Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement à certains sucres (présents sur les carbohydrates, glycoprotéines ou glycolipides), de façon similaire aux immunoglobulines. De nombreuses lectines végétales et animales sont utilisées pour étudier l'expression de l'antigène Tn. On peut citer par exemple la lectine végétale VVA-B4 (isolectine B4 de l'agglutinine *Vicia villosa*), ou la lectine animale HPA (agglutinine de *Helix pomatia*). Cependant, les résultats des études utilisant des lectines doivent être analysés avec précaution du fait de l'existence de réactions croisées avec des structures similaires à l'antigène Tn, comme par exemple le GM1, l'antigène de Forssman, et les antigènes du groupe sanguin A (Lescar J, 2007).

L'approche immunologique la plus récente pour détecter l'antigène Tn est l'approche utilisant les anticorps anti-Tn (que nous détaillerons plus précisément dans la partie III.C), mais il s'avère que les différents anticorps anti-Tn ne donnent pas les mêmes résultats entre eux. Une explication à ces fortes différences pourrait être que les anticorps utilisés pour détecter l'antigène Tn possèdent différentes spécificités fines du motif reconnu (Li Q, 2009; Mazal D, 2013), et que certains pourraient cross-réagir avec d'autres antigènes glycosidique différents de Tn. Par exemple, l'équipe de Leclerc C. *et al.* a montré que la séquence d'acides aminés (Sérine et Thréonine), portant le résidu GalNac de l'antigène Tn, joue un rôle important dans la spécificité de certains AcM anti-Tn dans les cancers du colon et du sein (Mazal D, 2013).

Les lectines et les anticorps anti-Tn, largement utilisés pour la détection de l'antigène Tn, ne ciblent pas toujours le même déterminant antigénique. Par exemple, l'épitope carbohydrate reconnu par la lectine VVA est différent de celui reconnu par l'AcM anti-Tn HB-Tn1 dans le cancer de l'utérus (Terasawa K, 1996) et dans le cancer du sein (Kawaguchi T, 2006). Une hypothèse serait que la lectine VVA pourrait se lier aussi bien à l'antigène Tn seul qu'à un groupe d'antigènes Tn, tandis que l'AcM HB-Tn1 ne pourrait se lier qu'à des groupes de plusieurs antigènes Tn consécutifs. Nakada H. *et al.* (1991) et Oppezzo P. *et al.* (2000) ont démontré cette éventualité avec d'autres AcM anti-Tn.

L'antigène Tn est un antigène spécifique des tumeurs. Il est exprimé sous forme démasquée à la surface des cellules tumorales dans environ 90% des cancers épithéliaux humains, tels que les cancers de l'ovaire, du sein, de la prostate, du colon, du pancréas… (Springer G, 1984, 1995, 1997 ; Itzkowitz S, 1989; Pancino G, 1990 ; Osinaga E, 1994 ; Beuzelin-Yvraut M, 1995 ; Croce M, 2001 ; Ju T, 2002, 2008 ; Guillot J, 2004 ; Li Q, 2009 ; Département d'Anatomopathologie [Dr. Sastre X]). Il a également été décrit dans certains cas de cancers hématologiques (Inoue M, 1994; Aller CT, 1996 ; Lawrie C, 2006). En revanche, il n'est pas détecté dans les cellules normales, dans lesquelles il n'est pas accessible au système immunitaire car masqué par d'autres sucres présents dans la chaîne saccharidique (Itzkowitz S, 1989 ; Pancino G, 1990 ; Beuzelin-Yvraut M, 1995 ; Cao Y, 1996 ; Croce M, 2001 ; Ju T, 2002, 2008 ; Li Q, 2009 ; Hubert P, 2011), excepté un faible marquage intracellulaire dans les cellules épithéliales au niveau des tractus bronchique et digestif inaccessibles aux anticorps par voie systémique (département d'anatomopathologie [Dr. Xavier Sastre] et Hubert P, Institut Curie, résultats non publiés).
Dans les cancers du sein ou du côlon, l'expression de l'antigène Tn apparaît très tôt dans l'évolution de la maladie et est corrélée au potentiel métastatique des carcinomes et à un mauvais pronostic (Leathem A, 1987; Brooks S, 2000, 2001, 2003; Kumar S, 2005), rendant cet antigène utilisable cliniquement comme biomarqueur de pronostic tumoral. Cependant, la fonction précise de l'antigène Tn dans la biogenèse des cancers est encore mal connue, contrairement à celle de l'antigène T, qui est impliqué dans la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules tumorales, mais aussi dans la métastase tumorale (Yu L, 2007). Il a cependant été décrit que le carbohydrate Tn est impliqué dans l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales lymphatiques (LECs, lymphatic endothelial cells) et donc dans la dissémination lymphatique des cellules tumorales (Itzkowitz S, 1989; Danussi C, 2009; Ju T, 2011). L'antigène Tn est également reconnu par un récepteur de c-lectines présent sur les macrophages (MGL, macrophage galactose-type lectin) (Singh S, 2009), suggérant une éventuelle fonction dans les interactions tumeur-monocyte.

L'antigène Tn représente donc une cible potentielle très intéressante pour l'immunothérapie passive par anticorps (Springer G, 1984, 1995; Guillot F, 2004), bien qu'il s'agisse d'une cible compliquée, car pouvant être portée par de nombreuses séquences protéiques, et pouvant être présentée sous forme de groupes de plusieurs motifs Tn ou de motif Tn individuel..
Du fait de la présence de concentrations variables d'autoanticorps contre l'antigène Tn, aussi bien chez les donneurs sains que chez les patients atteints de cancer, l'immunogène Tn est également un bon candidat pour l'immunothérapie active : en effet, l'immunisation de souris avec un antigène Tn

synthétique ou des mucines partiellement déglycosylées induit une réponse anticorps anti-Tn (de type IgG et IgM) dépendante des lymphocytes T $CD4^+$, permettant d'inhiber la croissance d'une tumeur de carcinome mammaire invasive exprimant l'antigène Tn (Lo-Man R, 2001, 2004 ; Singhal A, 1991 ; Freire T, 2006 ; Kunz H, 2003). Par exemple, le MAG-Tn3 (Multiple Antigenic Glycopeptide), mis au point par l'équipe de Leclerc C. *et al*, est un candidat-vaccin totalement synthétique. Il s'agit d'un glycopeptide contenant trois versions consécutives de l'antigène Tn associées à un peptide contenant un épitope T CD4+ capable de stimuler les réponses immunitaires cellulaires. Injecté à la souris, il entraîne la production d'anticorps IgG dirigés spécifiquement contre l'antigène tumoral Tn. Une vaccination prophylactique avec le MAG-Tn3 avant la greffe de cellules de carcinome mammaire portant l'antigène Tn protège les souris contre l'apparition d'une tumeur dans 70 à 90 % des cas, suivant la dose administrée. De plus, chez les souris déjà porteuses de la tumeur, le traitement par le vaccin MAG-Tn3 a permis de rejeter la tumeur dans 70% à 80% des cas (Lo-Man R, 2001).

Les effecteurs de cette réponse immune anti-Tn sont capables de lyser spécifiquement les cellules tumorales *in vitro* par un phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (*Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) via les cellules NK (Springer G, 1995; Lo-Man R, 1999, 2001, 2004).

## C. Les défenses du système immunitaire contre les cellules cancéreuses

Au tout début du XX$^{ème}$ siècle, Paul Ehrlich suggère pour la première fois l'existence d'une surveillance immunitaire active contre les cellules cancéreuses. Selon cette théorie très controversée, des cellules transformées naissantes apparaissent continuellement dans notre corps, mais le système immunitaire serait capable de les détecter et de les éliminer (ou de contrôler leur prolifération) avant qu'elles ne se manifestent cliniquement, et cela tout au long de notre vie (Ehrlich P, 1909). Ce n'est que cinquante ans plus tard que le postulat de Paul Ehrlich resurgit, grâce notamment à une meilleure compréhension du système immunitaire et à la description d'antigènes associés aux tumeurs (Old L, 1964). Ces découvertes ont formé la base de l'*immunosurveillance*, postulée par Burnet F. et Thomas L. (Burnet F, 1957; Thomas L, 1959). Des modèles murins de tumeurs spontanées ou induites chimiquement chez des souris immunocompétentes ou immunodéficientes ont permis d'obtenir des preuves expérimentales que les tumeurs pouvaient être réprimées par le système immunitaire (Burnet F, 1971; Stutman O, 1974,

1975; Thomas L, 1982). Par exemple, des souris déficientes pour les gènes RAG (Recombination Activating Gene), totalement déficientes en lymphocytes T et B, présentent une fréquence accrue de tumeurs spontanées et de tumeurs chimio-induites par rapport à des souris normales. De plus, dans les années 1990, les premiers antigènes tumoraux ont été identifiés par l'équipe de Boon T. (1992) témoignant d'une reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire.
Depuis, de nombreuses données, issues de modèles expérimentaux murins ou de patients atteints de cancer, ont validé le concept d'immunosurveillance, selon lequel le système immunitaire est capable d'identifier et de contrôler plus ou moins bien les cellules tumorales naissantes. Des travaux ont également montré que le niveau d'infiltration tumorale par des lymphocytes T, en particulier CD8+ mémoires, était corrélé avec un meilleur pronostic du cancer (Galon J, 2006). Toutefois, le système immunitaire peut également favoriser la progression tumorale notamment par inflammation chronique, immunosélection de variants faiblement immunogènes, et suppression de l'immunité antitumorale. Ensemble, ces actions contraires forment ce qu'on appelle l'*immunoediting*.

La *théorie des 3E* de Gavin Dunn et Robert Schreiber, réparti le concept de l'immunoediting en trois étapes distinctes, dans lesquelles le système immunitaire interagit avec les cellules tumorales : Élimination, Équilibre et Échappement (Dunn GP, 2002, 2004).

L'**élimination**, ou immunosurveillance, est la phase initiale pendant laquelle l'immunité innée et l'immunité adaptative travaillent ensemble afin de détecter et détruire les cellules transformées naissantes, bien avant que ces dernières soient apparentes cliniquement.

Au niveau cellulaire, le principal mécanisme immunitaire conduisant à l'élimination des tumeurs est la destruction des cellules cancéreuses par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (LTc) spécifiques d'antigènes tumoraux. Mais cette activité cytotoxique peut également être effectuée par les lymphocytes T CD4+ dans certains contextes.
La majorité des antigènes tumoraux déclenchant une réponse immunitaire chez les patients cancéreux sont des protéines cytosoliques synthétisées de manière endogène, dégradées dans le cytosol en petits peptides de 9 à 12 acides aminés, acheminés par les transporteurs TAP (*transporter associated with antigen processing*) dans le réticulum endoplasmique (RE). Ces petits peptides sont alors associés aux molécules du CMH de classe I afin d'être présentés aux LTc. Ainsi, les LTc CD8+ reconnaissent ces peptides antigéniques et détruisent les cellules portant ces antigènes. Pour cela, ils utilisent deux voies possibles. Dans la première voie, dite perforine/granzyme, les LTc libèrent des molécules, dont la perforine, qui créent des pores à la

surface de la cellule cible et permettent la pénétration d'autres enzymes, telles que les granzymes, qui clivent en aval d'autres molécules, les caspases, et induisent la mort de la cellule. Dans la seconde voie, une interaction entre les ligands Fas ou TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) exprimés à la surface des LTc et leurs récepteurs respectifs, exprimés par les cellules tumorales, conduit à une cascade d'évènements intracellulaires qui aboutissent à l'apoptose de la cellule cible (Bellet D, 2004).

Les réponses des lymphocytes T contre les tumeurs sont également induites par la reconnaissance des antigènes tumoraux sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) professionnelles de l'hôte (par exemple les cellules dendritiques DC). En effet, les CPA capturent les cellules tumorales ou les antigènes tumoraux et les ingèrent afin de générer des épitopes qui seront présentés aux lymphocytes T CD8+ et T CD4+ en association aux molécules CMH-I et CMH-II respectivement. Parallèlement, les CPAg professionnelles fournissent aux lymphocytes T des signaux de costimulation. Par exemple, le récepteur CD28 exprimé à la surface d'un lymphocyte T se lie aux protéines B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) exprimées à la surface des CPAg. Mais d'autres couples ligands/récepteurs activateurs permettent aussi de délivrer ce signal de costimulation positive (CD40/CD40L, OX40/OX40L…).

Ainsi, la combinaison de signaux venant du TCR (qui reconnaît le complexe CMH-peptide présenté par les CPA) et des interactions médiées par les molécules de costimulation permet l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T effecteurs. Toutefois, l'activation des lymphocytes T résulte d'un équilibre entre les signaux de costimulation activateurs et les signaux inhibiteurs qui permettent de maintenir une tolérance évitant l'auto-immunité et de moduler l'intensité et l'efficacité de la réponse immune effectrice. En effet, les lymphocytes T activés peuvent exprimer une grande variété de molécules de régulation négative telles que les molécules CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIM-4… (Pardoll D, 2012).

La réponse anti-tumorale développée *in vivo* doit être capable de déjouer les divers processus/sources d'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral médiés par des populations immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs (Treg), myeloid derived suppressor cells (MDSC)) ou par des facteurs solubles (IL-10, TGF-β…).

Le rôle de la réponse humorale contre les cellules tumorales n'est à l'heure actuelle toujours pas clairement établi. Cependant, le succès des anticorps monoclonaux en immunothérapie des cancers a constitué une avancée thérapeutique majeure durant ces dernières années.

Il a été montré toutefois que les Ac présents dans le sérum se fixent aux cellules tumorales et les opsonisent, permettant ainsi une meilleure présentation des Ag par les DC, et donc une meilleure induction des lymphocytes T CD8 (Dhodapkar KM, 2005).

Il arrive que des variants cellulaires tumoraux ne soient pas totalement détruits lors de l'étape d'élimination, et entrent dans une phase d'**équilibre** dans laquelle le système immunitaire contrôle leur croissance en les maintenant à un stade non-détectable cliniquement. Cette phase est la plus longue des trois, et peut durer jusqu'à plusieurs années. C'est durant cette phase que se produit la sélection immune de variants possédant une immunogénicité réduite.

La rupture de l'état d'équilibre conduit à la phase d'**échappement** durant laquelle les tumeurs d'immunogénicité réduite échappent au contrôle du système immunitaire, se mettent à proliférer progressivement, établissent un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, et deviennent à terme cliniquement apparentes, conduisant au développement du cancer. Nous détaillerons dans la partie suivante les différents mécanismes d'échappement mis en place par les cellules tumorales afin d'échapper au système immunitaire.

## D. Les mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire

Nous l'avons vu précedemment, il arrive que les réponses immunitaires ne parviennent pas à contrôler la croissance tumorale, et que les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes d'échappement au système immunitaire.
Le système immunitaire lui-même pousse les cellules cancéreuses à modifier leur phénotype tumoral, en exerçant sur celles-ci une pression de sélection, ou immuno-editing. Par cette pression, il sélectionne des variants tumoraux résistants aux différentes attaques du système immunitaire.
Divers mécanismes peuvent être éventuellement responsables de l'échec du système immunitaire contre les cellules tumorales.

- Les virus et bactéries attaqués par le système immunitaire sont composés de nombreuses protéines étrangères, alors que les cellules tumorales présentent des altérations souvent minimes par rapport aux cellules saines (protéines mutées ou tronquées), sans altérer pour autant leurs voies

métaboliques. Même lorsque l'on observe une expression élevée de certaines protéines ou une expression anormale de protéines fœtales, il s'agit généralement de protéines normales.

- Les défenses immunitaires doivent détruire la totalité des cellules tumorales, tandis que celles-ci se développent en général plus rapidement que les cellules saines de l'organisme, et se disséminent facilement.

- Certaines tumeurs stoppent la synthèse d'un antigène tumoral qui constitue la cible de l'attaque immunitaire. Lorsque cet antigène perdu n'est pas impliqué dans le maintient des propriétés malignes de la tumeur, les cellules tumorales continuent à croître et se disséminer dans l'organisme.

- Dans les cellules tumorales, l'expression membranaire des molécules du CMH-I peut-être fortement réduite voire même absente, de sorte que la reconnaissance des antigènes tumoraux par les lymphocytes T cytotoxiques devient impossible. Cependant, les cellules NK sont capables de reconnaitre les cellules déficientes en molécules de CMH-I, et peuvent ainsi les éliminer par un mécanisme de cytotoxicité dépendant de la perforine ou par des mécanismes induisant l'apoptose (interactions Fas/FasL, libération de granzyme B, sécrétion de TNFα…). Dans d'autres tumeurs, un défaut de l'apprêtage de l'antigène (par exemple un défaut de TAP), les rends incapables de transporter les peptides jusqu'au RE. De plus, contrairement aux cellules présentatrices d'antigène professionnelles, les cellules tumorales n'expriment pas les molécules costimulatrices CD80 et CD86 nécessaires à l'activation des lymphocytes T. En l'absence de co-stimulation, la présentation d'un peptide par les molécules du CMH peut induire une anergie ainsi qu'une tolérance des lymphocytes T.

- Certaines cellules tumorales peuvent également produire des molécules immunosuppressives (TGF-β, IL-6, IL-10, VEGF, PGE2...) pour échapper au système immunitaire.

- La tumeur recrute parfois dans son microenvironnement tumoral des cellules suppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives…) qui vont inhiber l'activité des lymphocytes infiltrant les tumeurs, produire des facteurs de croissance (EGF), ou encore des molécules pro-angiogéniques (VEGF, FGF...). Ainsi, la tumeur utilise certaines cellules du système immunitaire et les molécules qu'elles produisent pour leur propre croissance.

- Dans certains cas, les cellules cancéreuses expriment des molécules favorisant l'apoptose des lymphocytes, telles que Fas-L, PD-L1...

- Certaines cellules tumorales sont capables de résister à la lyse tumorale par les CTL et les cellules NK, soit par la voie perforine-granzyme, soit par la voie des récepteurs de signaux d'apoptose.
Dans le premier cas, il peut s'agir de mécanismes interférant avec les voies de signalisation pro-apoptotiques conduisant habituellement à l'apoptose des cellules cibles (expression de la serpine PI9/SPI6, un inhibiteur cellulaire du granzyme B), ou d'altérations des voies de signalisation pro-apoptotiques mitochondriales (surexpression de Bcl-2, de Bcl-xl, des IAP, mutations de Bax, Bak ou Apaf-1).
Dans le second cas, la résistance à l'apoptose implique le récepteur Fas. Il peut s'agir par exemple d'un défaut d'expression du récepteur Fas au niveau des cellules tumorales, ou d'une résistance à la lyse de la molécule c-FLIP. Cette protéine cytoplasmique anti-apoptotique agit comme un dominant négatif, inhibiteur de la caspase 8, prévenant ainsi l'apoptose induite par la voie Fas/FasL.

- Enfin, dans d'autres cas, les cellules cancéreuses expriment des molécules semblables aux molécules du CMH-I qui interagissent avec des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T.

Ainsi, au regard de ces différents mécanismes, il existe des effets bénéfiques mais aussi des effets potentiellement néfastes du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale.

Il faut garder à l'esprit que l'immunité antitumorale dépend de plusieurs facteurs tels que le type de cancer, le mode d'induction ou l'apparition spontanée des tumeurs. Par exemple, les cancers induits par les UV sont fortement immunogènes, alors que les tumeurs spontanées le sont moins.

## II. LES TRAITEMENTS ACTUELS CONTRE LE CANCER

L'arsenal thérapeutique utilisé actuellement pour le traitement des cancers comprend la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie.
Le choix du traitement anticancéreux doit être adapté au patient et dépend des caractéristiques de la tumeur, notamment sa localisation, son type et son stade d'évolution. En général, plusieurs modalités de traitement sont combinées. On peut distinguer les traitements locaux comme la chirurgie et la radiothérapie, et les traitements systémiques ou généraux tels que l'hormonothérapie et la chimiothérapie.

## A. Les traitements de routine

### 1. La chirurgie

Bénéficiant des progrès des techniques, en particulier de l'imagerie, la chirurgie reste le pilier incontournable du traitement de la plupart des tumeurs dites « solides » et non métastasés. Il s'agit d'un traitement local qui consiste à extraire la tumeur lorsque celle-ci est localisée en un endroit de l'organisme. Pour améliorer son efficacité, la chirurgie est souvent associée à un autre mode de traitement (chimiothérapie, radiothérapie).

La *chirurgie curative* consiste à retirer complètement la tumeur primitive. Afin d'assurer une marge de sécurité aussi large que possible, il convient d'exciser également les tissus sains environnants ainsi que les ganglions lymphatiques proches.
La *chirurgie prophylactique* consiste à enlever un organe sain mais potentiellement cancéreux, pour prévenir l'apparition d'un cancer. Ce type de chirurgie se pratique chez certaines personnes porteuses de mutations génétiques qui entraînent un risque élevé de cancer. Par exemple, l'ablation chirurgicale, d'un ou des deux sein(s) (mastectomie) peut être indiquée chez certaines femmes porteuses de mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (de l'anglais *BReast Cancer* : gènes codant pour des protéines intervenant dans plusieurs aspects de la régulation cellulaire, comme le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN).
La *chirurgie palliative* est réalisée lorsque la tumeur ne peut pas être excisée entièrement. On la pratique notamment lorsque la tumeur a dépassé un certain stade ou envahi les tissus environnants, lorsqu'elle est située dans une région difficile à aborder ou lorsqu'elle a déjà formé des métastases inopérables. L'intervention palliative permet alors de ralentir la croissance de la tumeur et de diminuer ou supprimer les douleurs, les complications ou le handicap de façon à ce que le patient puisse conserver une vie normale le plus longtemps possible.

### 2. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à utiliser des produits chimiques cytotoxiques afin de détruire les cellules cancéreuses et d'empêcher ou de ralentir leur dissémination au sein de l'organisme. En fonction des substances utilisées, on trouve différents modes d'action : certains médicaments

empêchent la division cellulaire (la cyclophosphamide, le paclitaxel, la vincristine…) et d'autres bloquent le cycle de croissance des cellules (la fludarabine, le méthotrexate, le 5-fluorouracile…).
Il s'agit d'un traitement systémique ou général car il concerne l'ensemble de l'organisme, et non un organe particulier. Leur toxicité envers les cellules saines, en particulier les cellules en croissance (cellules de la moelle osseuse et des muqueuses...), peut provoquer d'importants effets secondaires qui imposent d'administrer les agents chimiothérapeutiques à des doses sous-optimales.
On parle de *chimiothérapie adjuvante* ou *néo-adjuvante* lorsque la chimiothérapie est associée à la chirurgie ou à la radiothérapie. Dans la *chimiothérapie néo-adjuvante*, le traitement de chimiothérapie est débuté avant une intervention chirurgicale afin de faciliter l'opération en diminuant préalablement le volume de la tumeur. En revanche, en *chimiothérapie adjuvante* le traitement est initié après une opération chirurgicale afin d'éliminer les cellules cancéreuses qui seraient encore présentes dans l'organisme.
On utilise la *chimiothérapie palliative* dans la majorité des cas de cancer local avancé ou de cancer avec des métastases disséminées dans l'organisme, afin de freiner la progression de la tumeur et atténuer ses effets sans toutefois éliminer complètement la maladie.

## 3. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement fréquent du cancer qui consiste à exposer localement les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations ionisantes (rayonnements), tout en préservant, autant que possible, les tissus sains et les organes avoisinants. Les rayonnements altèrent l'ADN des cellules de façon à bloquer leur mécanisme de multiplication et à provoquer leur destruction. Selon les cas, la radiothérapie peut être associée à d'autres modes de traitements, comme la chirurgie et la chimiothérapie.
Il existe deux voies principales d'administration de la radiothérapie. Dans la *voie externe*, les rayons (rayon X ou gamma, photons, protons, électrons…) sont émis en faisceau par une machine, située à distance du patient, et traversent la peau pour atteindre la tumeur. Dans la *voie interne*, les sources radioactives ($^{192}$iridium, $^{137}$césium, $^{125}$iode…) sont implantées directement à l'intérieur de l'organisme ou de l'organe à traiter (curiethérapie) ou des produits radioactifs sont administrés par voie orale ou injectés (radiothérapie métabolique). La *curiethérapie* consiste à implanter de grains radioactifs à proximité immédiate ou directement à l'intérieur de la zone à traiter. Le nombre et l'emplacement de ces grains sont établis par ordinateur lors d'examens par imagerie médicale. L'action de la curiethérapie s'étale sur un an, contre à peine plusieurs semaines pour une

radiothérapie classique, et l'irradiation très localisée réduit considérablement les brûlures vésicales ou rectales, courantes lors d'une radiothérapie classique.

La *radiothérapie conformationnelle* est une technique de radiothérapie qui fait appel pour sa préparation aux images en trois dimensions fournies par le scanner ainsi qu'à d'autres techniques d'imagerie, de robotique… Elle permet de définir avec une grande précision la forme de la tumeur et d'adapter en conséquence les faisceaux d'irradiation, en préservant au mieux les organes sains avoisinants.

## 4. L'hormonothérapie

La croissance de certains cancers dits hormonodépendants est stimulée par des hormones, comme par exemple dans certains cas de cancer du sein, de la prostate et de l'endomètre. L'hormonothérapie consiste à empêcher l'action stimulante des hormones sur les cellules cancéreuses afin d'empêcher le développement de ces tumeurs et leurs éventuelles métastases.

Il est possible par exemple d'empêcher la production naturelle des hormones impliquées dans la multiplication des cellules cancéreuses (en supprimant l'activité de la glande qui les produit…). Il est possible aussi d'avoir recours à des anti-hormones qui prennent la place de l'hormone naturelle au niveau des récepteurs hormonaux des cellules. C'est le cas par exemple du Tamoxifène (Nolvadex®, Tamizan®, Tamoplex®) utilisé comme modulateur sélectif des récepteurs des estrogènes dans le traitement des carcinomes mammaires (Yang LH, 2012).

## 5. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des nouveaux traitements qui consistent à cibler précisément certaines caractéristiques des cellules cancéreuses qui les distinguent des cellules normales. Les progrès de la connaissance en biologie des tumeurs ont en effet permis d'identifier avec précision le rôle joué par un certain nombre de molécules dans le développement d'un cancer et de ses métastases. En s'attaquant à ces molécules, les thérapies ciblées visent à une plus grande efficacité et, parce qu'elles ne sont pas dirigées vers les cellules saines, entraînent moins d'effets secondaires que les chimiothérapies classiques.

Plusieurs types de cibles peuvent être visés par les thérapies ciblées, comme par exemple les facteurs essentiels à la croissance cellulaire ou à la survie, les facteurs favorisant l'angiogenèse, ou bien les facteurs déclenchant le mécanisme d'apoptose.

Certains inhibiteurs de kinases, telles que B-Raf, KIT, Her2, ont permis d'induire d'excellentes régressions dans certaines catégories de patients.
Par exemple, l'imatinib, un inhibiteur de la kinase BCR-ABL, induit rapidement des réponses cytogénétiques complètes dans 76% des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) (O'Brien SG, 2003). Cependant, ces effets bénéfiques sont malheureusement souvent suivis d'une recrudescence de la maladie et l'apparition de variants tumoraux résistants à la molécule thérapeutique.
Un autre exemple, l'ipilumimab, un anticorps immunomodulateur anti-CTLA-4, récemment approuvé par la FDA pour une utilisation chez les patients atteints de mélanomes avancés. Il permet une augmentation de la survie par rapport au traitement classique et surtout un bénéfice de plus de 2,5 années pour 15-20% des patients traités (Hodi FS, 2010).

## B. L'immunothérapie dans le traitement des cancers

Le but de l'immunothérapie anticancéreuse est de se servir du système immunitaire et de le stimuler afin d'aider à l'éradication sélective de la tumeur, sans nuire au patient, ou le moins possible. Les principales stratégies utilisées ont pour objectif de fournir des effecteurs antitumoraux (anticorps, lymphocytes T, cellules dendritiques...) aux patients, de les immuniser activement contre leurs tumeurs en stimulant leurs réponses immunitaires antitumorales. L'immunothérapie est un domaine très étudié dans le traitement des cancers.

### 1. L'immunothérapie active

L'*immunothérapie active* consiste à administrer des substances qui vont stimuler le système immunitaire de l'organisme afin de détruire les cellules cancéreuses. Cela peut se faire soit par l'administration de cytokines, non spécifique d'antigènes, soit sur le principe de la vaccination, spécifique d'antigènes.

La production de cytokines en quantités importantes par génie génétique permet de stimuler, de façon orientée, des lymphocytes du malade contre les cellules tumorales. Parmi les cytokines utilisées en immunothérapie, l'interleukine 2 (IL-2) est utilisée depuis de nombreuses années dans le traitement du cancer du rein (Harada K, 2011), l'interféron alpha (IFNα) dans le traitement des mélanomes (Tarhini AA, 2009). D'autres cytokines montrent une efficacité thérapeutique

lorsqu'elles sont utilisées en association avec des substances antitumorales comme le TNF, dans le traitement des sarcomes des membres.
Cependant, ces cytokines agissent à l'aveugle et sont à l'origine d'effets secondaires plus ou moins toxiques.

En général, le terme de vaccination est utilisé pour désigner une immunisation appliquée à titre prophylactique. Toutefois, en cancérologie, il désigne aussi les tentatives de stimulation des réponses antitumorales chez les personnes qui sont déjà atteintes de cancer, afin d'obtenir une réponse ciblée, autonome et à long terme. Dans la pratique, le développement de vaccins thérapeutiques du cancer constitue encore une voie de recherche.

Parmi les stratégies de vaccination, on peut citer :
- les idiotypes des immunoglobulines de surface des lymphomes B, afin de favoriser la production par le système immunitaire d'anticorps anti-idiotypiques. Cette approche est limitée aux lymphomes B et aux cancers hématologiques apparentés.
- les cellules tumorales intactes et irradiées (autologues ou allogéniques)
- les lysats de tumeurs, tel que le lysat de mélanome Melacine ®
- les cellules tumorales génétiquement modifiées, capable d'exprimer certaines molécules de costimulation ou de secréter certaines cytokines
- les peptides contenant des épitopes présentés par le CMH-I, notamment des épitopes d'Ag de différenciation et d'antigènes communs au cancer et aux testicules utilisés pour traiter les patients atteints de mélanome.
- les complexes HSP-peptide (*Heat-shock proteins*, protéines de choc thermique) dérivés de la tumeur autologue. Les HSPs (généralement la hsp70), en plus de leur fonction d'adjuvant, jouent un rôle dans l'internalisation des peptides dans les CPAg, facilitant ainsi la présentation antigénique aux cellules du système immunitaire (Srivastava PK, 2009).
- les exosomes dérivés des cellules dendritiques sont utilisés pour transporter des peptides vaccin et augmenter leur activité antitumorale (Viaud S, 2010).

## 2. L'immunothérapie adoptive

L'*immunothérapie adoptive* consiste à prélever au patient des cellules immunitaires destinées à agir contre les cellules cancéreuses, à les manipuler *ex vivo*, puis à les réinjecter au patient.

Il peut s'agir par exemple d'un transfert adoptif de lymphocytes T autologues. Ces derniers sont isolés du sang ou d'un infiltrat tumoral d'un patient cancéreux, puis ceux reconnaissant la tumeur sont sélectionnés. Les lymphocytes T sont ensuite mis à proliférer *in vitro* en présence de facteurs de croissance afin de les amplifier et d'en obtenir de grandes quantités, puis sont finalement réinjectés chez le même patient. Jusqu'à présent, cette stratégie a démontré son utilité dans certains cancers hématologiques (Rosenberg SA, 2008), mais également chez des patients atteints de mélanome (Khammari A, 2009).
Les lymphocytes T peuvent également être manipulés *ex vivo* avant leur réintroduction chez le patient. Le récepteur d'antigènes des lymphocytes T (TCR, T cell receptor) est composé des chaînes α et β qui s'associent à un complexe protéique composé des chaînes CD3 ε, δ et ζ, pour transduire le signal d'activation lors de la reconnaissance de peptides présentés spécifiquement par le CMH. Ainsi, le clonage des chaînes α et β peut permettre la reconstitution d'un TCR transgénique et rediriger les fonctions du lymphocyte T contre un antigène tumoral (June CH, 2007).

Il peut s'agir également de cellules dendritiques. Pour cela, les monocytes sont isolés à partir du sang du patient cancéreux par leucaphérèse. Puis ils sont purifiés, placés *in vitro* et différenciés en cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques autologues sont ensuite chargées de peptides antigéniques, de protéines entières ou de lysats de tumeurs, et sont rendues matures en présence de stimuli (cytokines...). Une fois réinjectées au patient, ces cellules sont capables d'activer les effecteurs du système immunitaire afin d'éliminer les cellules tumorales.
Le vaccin cellulaire Sipuleucel-T (Provenge®) a été approuvé par la FDA en Avril 2010, et est utilisé dans le traitement des cancers de la prostate métastasiques, résistants à l'ablation. Il s'agit de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC, peripheral blood monocuclear cells) autologues, composées de 18,6% de cellules dendritiques, 65,1% de lymphocytes T, 16,6% de monocytes et 5% de lymphocytes B (Burch PA, 2000). Ces PBMCs ont été chargées *ex vivo* en présence de la protéine de fusion PAP-GMCSF, constituée par l'antigène PAP humain (phosphatase acide prostatique, présente dans 95% des cellules cancéreuses de la prostate), et le facteur de croissance stimulant les granulocytes et macrophages (GM-CSF, human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Burch PA, 2000). Ce vaccin cellulaire permet d'augmenter de 4 mois la médiane de survie des patients, avec peu de toxicité (Kantoff, 2010).

### 3. L'immunothérapie passive

L'*immunothérapie passive* consiste à injecter, dans l'organisme du patient cancéreux, des protéines normalement produites par les cellules du système immunitaire sans que l'objectif de la thérapie soit nécessairement la stimulation de l'immunité.

L'*immunothérapie passive par anticorps* consiste à injecter au patient des immunoglobulines dirigées contre les cellules cancéreuses. Des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre différents antigènes tumoraux, et parfois couplés à des toxines puissantes, ont prouvé leur efficacité dans le traitement de nombreuses formes de cancers (Adams GP, 2005; Vacchelli E, 2013). Les AcM utilisés en thérapeutique se lient aux molécules cibles exprimées par les cellules cancéreuses (généralement en surface) puis, soit ils activent les mécanismes effecteurs de l'hôte (phagocytes, système du complément), soit ils délivrent les toxines directement aux cellules cancéreuses. Il s'agit d'une immunothérapie passive, car les anticorps ont une action immédiate mais transitoire, ils n'ont pas d'effet mémoire.
On peut citer par exemple le Trastuzumab, un AcM dirigé contre le produit de l'oncogène *HER2/neu* surexprimé dans certains cancers du sein et qui a été autorisé dans le traitement des patientes souffrant de ce type de tumeurs. On peut citer également le Rituximab, un AcM spécifique de la molécule CD20 exprimée sur les lymphocytes B, et utilisé pour traiter les tumeurs de lymphocytes B, généralement en association avec une chimiothérapie.

## III. LES ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES

### A. Les anticorps et les récepteurs Fc

Les anticorps (Ac), ou immunoglobulines, sont des glycoprotéines exprimées sous deux formes : elles sont présentes à la surface des lymphocytes B matures (où elles interviennent comme récepteurs pour l'antigène) ou produites et sécrétées dans le plasma sanguin par ces lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Les anticorps sécrétés dans la circulation sanguine sont capables d'atteindre n'importe quel site périphérique, et ainsi d'exercer leurs fonctions dans tout l'organisme. Ils se lient à l'épitope de l'antigène qui a déclenché leur production par les plasmocytes, avec un degré élevé de spécificité et une forte affinité.

## 1. Structure des anticorps

L'IgG1 humaine illustre bien la structure de base des molécules d'Ig. Elle est constituée de quatre chaînes polypeptidiques : Deux chaînes lourdes (heavy chain, H) identiques et formées d'environ 450 acides aminés, et deux chaînes légères (light chain, L) identiques entre elles, contenant environ 220 acides aminés chacune.
Un pont disulfure (S-S) relie chaque chaîne légère à une chaîne lourde, et deux autres ponts disulfures joignent les deux chaînes lourdes en leur milieu. Le nombre et les positions des ces liaisons interchaînes diffèrent selon les classes et les sous-classes des immunoglobulines.

Les chaînes H et L comprennent deux régions distinctes : une région constante (C) située à l'extrémité carboxy-terminale, et une région variable (V), située à l'extrémité amino-terminale. La région constante (Fc) montre peu de variabilité entre les diverses immunoglobulines, alors que la région variable (Fab) est caractérisée par une variabilité extrême de la séquence primaire, et constitue le site de fixation à l'antigène.
Les chaînes légères sont composées de deux domaines de taille similaire (environ 110 acides aminés) : VL et CL. Les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3), excepté les IgM et les IgE, qui comprennent quatre domaines constants.

Les domaines variables des chaînes lourdes et légères contiennent trois régions avec une variabilité extrême de la séquence en acides aminés, appelées régions de complémentarité (Complementarity determining region, CDR). Ces courtes régions hypervariables de 6 à 8 acides aminés déterminent la spécificité de la liaison de l'antigène. La substitution d'un seul acide aminé dans ces séquences peut avoir un effet important sur la fixation de l'antigène.
La partie constante des immunoglobulines déclenche les fonctions effectrices telles que la fixation du facteur du complément C1q et l'interaction avec les récepteurs spécifiques (récepteurs Fc) de différentes cellules effectrices (phagocytes, neutrophiles, cellules NK...).

## 2. Les différentes classes d'immunoglobulines

Chez les mammifères supérieurs, on peut distinguer cinq classes distinctes d'immunoglobulines, ou isotypes.

Chaque classe est caractérisée par ses propriétés physico-chimiques : structure chimique, fonctions effectrices, concentration moyenne dans le sérum, demi-vie... (Tableau I)

L'isotype d'un Ac est déterminé par la séquence de la région constante de sa chaîne lourde : α, δ, ε, γ et μ, respectivement pour les IgA, IgD, IgE, IgG et IgM.

Les chaînes légères comportent deux isotypes distincts chez l'homme et la souris : kappa κ (60%) et lambda λ (40%). Ces deux formes diffèrent par leur structure et sont présentes chez tous les individus.

Une molécule d'anticorps définie possède deux chaînes lourdes identiques, et deux chaînes légères identiques.

**Tableau I: Les différentes classes d'immunoglobulines humaines et leurs caractéristiques**

| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgM | IgA1 | IgA2 | IgD | IgE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Chaîne lourde** | $\gamma_1$ | $\gamma_2$ | $\gamma_3$ | $\gamma_4$ | μ | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | δ | ε |
| **Poids moléculaire (kDa)** | 146 | 146 | 170 | 146 | 970 | 160 | 160 | 184 | 188 |
| **Demi-vie (jours)** | 21 | 20 | 7 | 21 | 10 | 6 | 6 | 3 | 2 |

Durant les premiers jours suivant le contact avec l'Ag, les lymphocytes B naïfs produisent principalement des anticorps de classe IgM (qui possèdent des fonctions d'agglutination, de précipitation et d'activation de l'inflammation). On parle de réponse anticorps primaire. Cette réponse est lente avec un taux d'Ac relativement faible.

Suite à un contact prolongé ou répété avec l'Ag, les lymphocytes B différenciés produisent alors principalement des Ac de classe IgG, mais aussi de classe IgA ou IgE. Il s'agit d'une réponse secondaire plus rapide que la réponse primaire, avec un taux d'Ac beaucoup plus élevé et qui persistera plus longtemps dans le temps (réponse mémoire).

L'IgG humaine représente l'isotype le plus abondant du sérum, c'est-à-dire environ 70 à 80% de la quantité totale des Ig sériques. Il s'agit d'une molécule monomérique dont le poids moléculaire est de 146 à 170 kDa. Les IgG sont subdivisées en 4 sous-classes suivant la séquence en acides aminés de leurs chaînes lourdes gamma : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Chez la souris, on trouve également 4 sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3, mais il n'y a pas de correspondance directe entre les différentes sous-classes humaines et murines.

Les IgA dominent dans les sécrétions des muqueuses (salive, sécrétions du système bronchique et des voies urinaires, larmes, colostrum, lait maternel). La plupart des IgA du sérum sont monomériques, à l'exception de quelques dimères et polymères. Il existe deux sous-classes d'IgA chez l'homme : IgA1 et IgA2.

Les IgM forment majoritairement des complexes pentamériques, à l'exception de quelques complexes multimériques et de quelques monomères. Cet isotype représente les immunoglobulines de surface des lymphocytes B matures, et est majoritaire lors de la réponse primaire.
Les IgD sont des monomères qui représentent à l'état libre moins de 1% des immunoglobulines plasmatiques. Elles sont aussi fréquemment trouvées à la surface des lymphocytes B matures. Sa fonction précise dans le sérum est encore inconnue.
Les IgE sont des monomères à quatre domaines constants, présents sous forme de traces dans le sérum. Elles jouent un rôle important dans la défense contre les parasites et dans les réactions d'hypersensibilité immédiate.

## 3. Les fonctions effectrices médiées par les anticorps

Pour être efficaces, les anticorps doivent non seulement reconnaître l'antigène, mais aussi susciter des réponses immunitaires, des fonctions effectrices. Ils peuvent agir par des mécanismes directs ou des mécanismes indirects.
Nous citerons ici les mécanismes généraux des anticorps, mais nous détaillerons plus loin les mécanismes des anticorps monoclonaux en thérapeutique.
Parmi les mécanismes directs, on peut citer :
- La neutralisation de l'antigène : La réaction antigène-anticorps bloque ou neutralise certaines toxines bactériennes et empêche la fixation de certains virus sur les cellules de l'organisme.
- L'immobilisation des microorganismes bactériens : Les anticorps se fixent aux antigènes des flagelles de bactéries mobiles, limitant ainsi leur dissémination dans les tissus avoisinants.
- L'agglutination et la précipitation des antigènes : La réaction antigène-anticorps peut entraîner la réticulation des agents pathogènes et causer leur agglutination, ce qui permet aux phagocytes de les éliminer plus facilement.
Cependant, ces trois mécanismes sont impliqués dans les réponses humorales contre les pathogènes, mais n'interviennent pas dans un contexte tumoral.

Dans les mécanismes d'action indirects, plusieurs anticorps se lient par leurs régions Fab aux antigènes présents à la surface d'une cellule cible et en recouvrent sa surface (opsonisation), les fragments Fc se retrouvent orientés vers l'extérieur et ainsi exposés aux différents composants des défenses de l'hôte, notamment les phagocytes, les neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK) et le système du complément.

La liaison efficace des cellules effectrices ou du complément aux anticorps ne se produit que si plusieurs molécules d'Ig sont fixées à l'antigène. Cela garantit que les mécanismes effecteurs ne soient déclenchés que lorsque les anticorps ont reconnu leurs antigènes cibles.
Tous les isotypes d'immunoglobuline, à l'exception de l'IgD, sont bifonctionnels : ils se lient à l'antigène et exercent une ou plusieurs fonctions effectrices.

Ainsi, parmi les mécanismes indirects, on peut citer :
- La potentialisation de la phagocytose : Les anticorps augmentent l'activité de phagocytose des phagocytes en causant l'agglutination et la précipitation des antigènes, en activant le complément et en enrobant les cellules tumorales (opsonisation).
- L'activation du complément : Les complexes antigène-anticorps déclenchent la voie classique du système du complément. On parle de cytotoxicité dépendante du complément (CDC).
- L'intervention de cellules effectrices : La cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC).

Nous détaillerons plus loin les mécanismes d'ADCC de CDC.

## 4. Les récepteurs Fc

De nombreuses cellules présentent des glycoprotéines membranaires appelées récepteurs Fc qui reconnaissent les régions constantes Fc carboxy-terminales des molécules d'anticorps sécrétées. Ces récepteurs sont généralement des complexes protéiques à plusieurs chaînes qui comprennent des composants de liaisons aux Ig et des composants de signalisation. Les récepteurs Fc sont essentiels pour de nombreuses fonctions effectrices des anticorps, comme la phagocytose des germes opsonisés par des anticorps, l'activation des mastocytes induite par l'antigène, l'activation des cellules NK...

Il existe différents types de récepteurs Fc, notamment ceux qui sont spécifiques des différents isotypes IgG, IgE et IgA, appelés respectivement FcγR, FcεR et FcαR. Nous nous intéresserons ici principalement aux FcγR.

Les récepteurs de surface cellulaire pour la région Fc de l'IgG (FcγR) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comportent deux ou trois domaines extracellulaires d'immunoglobulines. Ils sont exprimés sur la majorité des cellules myéloïdes et sur certaines cellules lymphoïdes. Chaque type cellulaire exprime généralement plusieurs classes de FcγR.

### a) Les récepteurs FcγR humains

Trois classes de FcγR ont été caractérisées chez l'homme. Ils sont dénommés FcγRI, FcγRII et FcγRIII par l'Union internationale des sociétés d'immunologie (IUIS), et CD64, CD32, CD16 respectivement, dans la numérotation des classes de différenciation (CD).

Les récepteurs FcγRs humains diffèrent dans leur structure, leur fonction, leur distribution cellulaire, et dans leur affinité pour le fragment Fc des différents isotypes d'anticorps.
Le FcγRI (CD64 ; 72 kDa) possède une grande affinité pour les IgG1 et IgG3. Il a une distribution cellulaire restreinte, mais est exprimé sur toutes les cellules de la lignée des phagocytes mononucléaires. Il est impliqué dans la phagocytose des complexes immuns (par les macrophages et les neutrophiles), dans la libération de médiateurs...

Le FcγRII (CD32 ; 40 kDa) est exprimé sous trois formes distinctes quant à leur structure, leur fonction et leur distribution cellulaire : FcγRIIA, exprimé sur les monocytes, neutrophiles, éosinophiles et pDC (Bave 2003) et FcγRIIB, exprimé sur les lymphocytes B, et enfin, le FcγRIIc, exprimé sur les cellules NK.

Le FcγRIII (CD16 ; 50-80 kDa) est exprimé sous deux formes distinctes quant à leur structure, leur fonction et leur distribution cellulaire : FcγRIIIA et FcγRIIIB. Le FcγRIIIA est une protéine transmembranaire exprimée sur les monocytes, macrophages, cellules NK et certaines cellules T. Le FcγRIIIB est une protéine ancrée dans la membrane par un groupe GPI (Glycosyl phosphatidyl inositol), exprimée sélectivement par les neutrophiles.

Il existe cinq récepteurs FcγRs activateurs (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA and FcγRIIIB), et un récepteur FcγR inhibiteur (FcγRIIB).

Les récepteurs FcγRI et FcγRIIIA sont des récepteurs activateurs composés d'une région transmembranaire ainsi que d'une courte région intracytoplasmique. La région transmembranaire comprend un résidu chargé permettant au récepteur de s'associer au dimère d'une chaîne transductrice FcR-γ. Cette chaîne γ possède une très courte région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intracytoplasmique comportant un motif de transduction de type ITAM impliqué dans l'activation cellulaire. En effet, lorsque les récepteurs FcγRI et FcγRIIIA s'agrègent avec des complexes immuns (formés d'antigènes et d'IgG), la phosphorylation du motif

ITAM par des tyrosines kinases déclenche des activités telles que la phagocytose, l'ADCC, la libération de médiateurs et l'amplification de la présentation antigénique.

Les récepteurs FcγRIIA et FcγRIIC sont également des récepteurs activateurs, mais possédant leur propre motif de transduction ITAM dans leur région intracytoplasmique. Ils n'ont donc pas besoin de chaînes accessoires pour entraîner l'activation cellulaire.

Le récepteur FcγRIIB est le seul récepteur inhibiteur. Il possède son propre motif de transduction ITIM dans sa région cytoplasmique qui, une fois phosphorylé par des tyrosines kinases, bloque l'activation cellulaire.

Enfin, le récepteur FcγRIIIB est un récepteur atypique, de faible affinité. En effet, il s'agit d'une protéine sans région cytoplasmique, reliée à la membrane par une liaison GPI, et localisée principalement dans les radeaux lipidiques. Ce récepteur ne possède donc pas de capacité intrinsèque de transduction de signal. Il peut cependant coopérer avec d'autres récepteurs (FcγRIIA) amenant à proximité de ces derniers des éléments de signalisation associés aux radeaux lipidiques.

Chez l'homme, il a été montré que les IgG1 et les IgG3 se fixent efficacement à tous les types de FcγR et constituent donc de bons candidats pour induire des activités effectrices. En revanche, les IgG2a se lient princiaplement au récepteur activateur FcγRIIa et avec une moindre affinité (Bruhns P, 2009).

### b) Les récepteurs FcγR murins

Malgré la proximité phylogénétique entre l'homme et la souris, il existe de nombreuses différences entre les FcγRs des deux espèces. La souris, contrairement à l'homme, ne possède que trois récepteurs activateurs (le FcγRI, le FcγRIII et le FcγRIV), et un récepteur inhibiteur (le FcγRII) avec des profils d'expression différents des FcγR humains.

Le FcγRI est exprimé par les monocytes, les macrophages, les DCs.
Le FcγRIII est exprimé par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les DCs, les cellules NK.
Le FcγRIV est exprimé par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles.

Le FcγRIIB est exprimé par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les DCs, les lymphocytes B.

Si l'on se base sur la localisation génomique et les similarités de séquence des régions extracellulaires, le FcγRIV murin pourait être apparenté au FcγRIIIA humain, et le FcγRIII murin, au FcγRIIA humain. Cependant, malgré ces similarités, il existe des différences dans les régions intracellulaires et dans la distribution cellulaire, qui doivent être prises en compte lors de l'extrapolation de données de l'animal à l'homme.
En ce qui concerne l'affinité des différentes sous-classes d'immunoglobulines pour chacun des FcγR, il existe des variations entre les systèmes murins et humains, mais les principes mis en évidence chez la souris sont applicables aux RFc et aux anticorps humains (Nimmerjahn F, 2005).

L'affinité de fixation sélective des anticorps aux différents récepteurs FcγR selon les isotypes pourrait prédire l'efficacité thérapeutique des anticorps induisant une activité cytotoxique sur les cellules tumorales (Nimmerjahn F, 2005). Par exemple, dans un modèle de souris traitées avec des Ac anti-CD20 de différents isotypes, il a été montré que l'IgG2a était l'isotype le plus efficace pour supprimer les lymphocytes B CD20+ et que les récepteurs activateurs I et III étaient nécessaires au processus (Uchida J, 2004).

## B. Les anticorps monoclonaux à usage thérapeutique

### 1. Production d'anticorps monoclonaux

Il est possible de récolter dans le sang d'un individu les anticorps produits en réaction contre un antigène donné. Cependant, les anticorps obtenus sont dits polyclonaux, car plusieurs clones de plasmocytes participent à la réponse immune, généralement dirigée contre plusieurs épitopes de l'antigène (réponse polyclonale). Il faudrait alors isoler un plasmocyte particulier et le faire proliférer afin qu'il produise un clone de plasmocytes identiques, ce qui permettrait d'obtenir une grande quantité d'anticorps également identiques. Malheureusement, il est difficile de cultiver les lymphocytes B et les plasmocytes *in vitro*.
Mais cette difficulté a été contournée. Pour cela, un animal (en général un rongeur) est immunisé avec l'antigène cible, et ses plasmocytes sécrétant les anticorps d'intérêt sont isolés à partir de la rate. Ces derniers sont ensuite fusionnés avec une lignée tumorale (par exemple les cellules de

myélomes lymphoïdes murins X63) qui se cultivent facilement et prolifèrent indéfiniment *in vitro*. La lignée de cellules hybrides obtenue, ou hybridome, conserve les deux propriétés des cellules mères, c'est-à-dire la multiplication indéfinie dans un milieu de culture approprié, et la sécrétion abondante d'anticorps purs et identiques, dits monoclonaux, car provenant d'un clone unique de cellules identiques.

La plupart des AcM spécifiques d'antigènes associés à des tumeurs humaines sont produits chez la souris. Ces AcM murins sont utilisés dans l'immuno-détection et l'immunothérapie de certains cancers. Cependant, ces anticorps provoquent chez le patient le développement d'une réponse immunitaire humaine à l'encontre de la partie constante de ces immunoglobulines murines (production d'anticorps humains anti-anticorps de souris : *Human Anti-Mouse Antibodies*, HAMA). Cette réponse immunitaire peut causer des réactions toxiques ainsi que l'élimination rapide de l'anticorps, provoquant alors une diminution de la demi-vie de ces anticorps murins dans la circulation sanguine et donc une diminution de l'activité biologique. De plus, les AcM murins interagissent moins efficacement avec les cellules effectrices humaines jouant un rôle dans la destruction des tumeurs (Smith MR, 2003).

Les avancées en biologie moléculaire et en ingénierie génétique ont rendu possible le clonage des gènes codant pour les immunoglobulines humaines et murines. Cela a permis de générer des anticorps chimériques souris/homme (possédant la totalité de la région variable d'un AcM murin et la région constante d'une immunoglobuline humaine) ainsi que des anticorps humanisés (dans lesquels les régions hypervariables [CDR] d'un AcM murin ont été greffées sur une IgG humaine). Pour augmenter leur efficacité thérapeutique, ces AcM sont souvent fabriqués à partir d'$IgG_1$ (chaîne lourde $\gamma 1$), la sous-classe d'IgG ayant à la fois une demi-vie relativement longue et induisant des activités cytolytiques importantes. En effet, l'isotype $G_1$ peut permettre différentes fonctions effectrices, incluant l'ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity), la CDC (complement-dependent cytotoxicity), la cytotoxicité directe par apoptose…

Ces AcM chimériques et humanisés présentent de nombreux avantages en immunothérapie passive par anticorps: ils permettent notamment d'augmenter l'activité biologique, en améliorant la demi-vie de circulation et en réduisant l'immunogénicité chez l'homme (production de *HAMA* limitée et production d'anticorps humains anti-anticorps chimériques : *Human Anti-Chimeric Antibodies* [HACA] quasi-inexistante).

Le nom des AcM utilisés en thérapeutique suit une nomenclature (DCI) se terminant par le suffixe -mab (pour *monoclonal antibody*). Il y a quatre dénominations suivant l'origine des AcM (Tableau II).

**Tableau II : Nomenclature des anticorps monoclonaux**

| Origine | Suffixe | Exemple |
|---|---|---|
| **Murin** | -omab | muronomab |
| **Chimérique** | -ximab | rituximab |
| **Humanizé** | -zumab | alemtuzumab |
| **Humain** | -mumab | adalimumab |

## 2. Quelques exemples emblématiques d'anticorps monoclonaux

Les AcM sont largement utilisés en recherche, pour le diagnostic clinique et en thérapeutique. Quelques exemples d'anticorps monoclonaux largement utilisés en pratique clinique peuvent être cités (Tableau III).

**Tableau III: Les principaux anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés par la FDA**

| | Isotype | Cible | Indications | Approbation |
|---|---|---|---|---|
| **Kadcyla® Trastuzumab emtansine** | IgG1 humanisée | HER2 | Cancer du sein | 2013 |
| **Adcetris® Brentuximab vedotin** | IgG1 chimérique | CD30 | Lymphome hodgkinien | 2011 |
| **Yervoy® Ipilimumab** | IgG1 humaine | CTLA-4 | Mélanome métastatique | 2011 |
| **Arzerra® Ofatumumab** | IgG1 humaine | CD20 | Lymphome à cellules B | 2009 |
| **Vectibix® Panitumumab** | IgG2 humaine | EGFR | Cancer colorectal | 2004 |
| **Erbitux® Cetuximab** | IgG1 chimérique | EGFR | Cancer colorectal | 2004 |
| **Avastin® Bevacizumab** | IgG1 humanisée | VEGF | Cancer colorectal | 2004 |
| **Bexxar® Tositumomab-$^{131}$I** | IgG2a murine | CD20 | Lymphome non hodgkinien | 2003 |
| **Zevalin® Ibritumomab** | IgG1 murine | CD20 | Lymphome | 2002 |
| **Campath® Alemtuzumab** | IgG1 humanisée | CD52 | Leucémie lymphocytaire chronique<br>Leucémie myéloïde aigue | 2001 |
| **Mylotarg® Gemtuzumab** | IgG4 humanisée | CD33 | Leucémie myéloïde aigue | 2000 |
| **Herceptin® Trastuzumab** | IgG1 humanisée | HER2 | Cancer du sein | 1998 |
| **Rituxan® Rituximab** | IgG1 chimérique | CD20 | Lymphome non hodgkinien,<br>Lymphome à cellules B,<br>Leucémie lymphocytaire chronique | 1997 |

- Le **rituximab** (Rituxan®, MabThera®) est un AcM chimérique IgG1 anti-CD20 utilisé, généralement en association avec une chimiothérapie, dans le traitement de certains lymphomes folliculaires et dans les lymphomes agressifs à grandes cellules B. Il se fixe spécifiquement et avec une haute affinité sur la protéine transmembranaire CD20 exprimée sur certains lymphocytes B matures et sur la plupart des cellules de lymphome à cellules B (Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004). Étant donné que le CD20 n'est pas exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, la population de lymphocytes B normaux se reconstitue après l'interruption du traitement. Il s'agit du premier AcM approuvé par la FDA (1997).
- Le **trastuzumab** (Herceptin®) est le deuxième AcM qui a été approuvé par la FDA en 1998. Il s'agit d'un AcM IgG1 humanisé anti-Her2 utilisé dans le traitement des cancers du sein métastasiques Her2+ (environ 25% des cancers du sein). Il reconnait un épitope extracellulaire de la protéine transmembranaire HER-2/neu (ou ErbB2, récepteur 2 de l'*Epidermal Growth Factor* humain, EGF) surexprimée dans certains carcinomes mammaires invasifs (Austin CA, 2004; Christiansen J, 2004). Cependant, l'antigène cible HER2 étant également présent à la surface de certaines cellules normales, comme les cellules cardiaques, le trastuzumab peut montrer des signes de toxicité, notamment cardiaque.
Néammoins, le trastuzumab reste un AcM de réference dans le traitement des cancers du sein Her2+. Par ailleurs, le Trastuzumab couplé à l'agent toxique DM1 (**trastuzumab emtansine**, Kadcyla®) a été approuvé récemment par la FDA (2013).

- L'**alemtuzumab** (MabCampath®) est un AcM IgG1 humanisé spécifique de la glycoprotéine CD52 située à la surface de certains lymphocytes. Son indication principale est la leucémie lymphoïde chronique devenue résistante à certaines substances de chimiothérapie.

- Le **cetuximab** (Eribitux®) est un AcM IgG1 chimérique qui se lie spécifiquement au récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) impliqué dans de nombreux cancers (poumon, côlon...). Il est utilisé dans les cancers du côlon métastasiques ayant résisté à une chimiothérapie première.

## 3. Les anticorps recombinants

La majorité des anticorps thérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers sont des Immunoglobulines IgG entières, mais depuis quelques années, notamment grâce aux progrès de

l'ingénierie des anticorps (technique du "phage-display"), il est possible d'obtenir différents formats d'anticorps (fragments d'anticorps, anticorps bispécifiques…).
Les fragments d'anticorps recombinants possèdent de nombreux avantages par rapport aux Ig complètes : En effet, ils conservent, vis-à-vis des antigènes, la spécificité de liaison des AcM correspondants, mais ils possèdent en plus un volume de distribution plus élevé, une efficacité plus rapide, une meilleure clairance plasmatique ainsi qu'une immunogénicité réduite. En revanche, suivant leur construction, ils conservent ou non la possibilité d'interagir avec les effecteurs du système immunitaire ou avec le système du complément via leur fragment Fc.
Ces fragments d'anticorps présentent un grand intérêt en cancérologie car ils peuvent être conjugués à des toxines, des enzymes ou d'autres substances.

Les fragments **Fab** (50 kDa) sont des fragments monovalents, qui conservent leur spécificité vis-à-vis de l'antigène, mais qui on perdu leur région Fc, les empêchant d'intéragir avec les cellules effectrices du système immunitaire. Ils sont donc généralement obtenus à partir d'anticorps dont l'efficacité *in vivo* ne dépend pas de cette région Fc. Ces fragments peuvent par exemple être utilisés en imagerie, ou pour être couplé à des radioisotopes, à des molécules toxiques…
Les fragments **$F(ab')_2$** (100 kDa) sont des fragments bivalents composés de deux fragments Fab reliés ensemble par des ponts disulfure. Grâce à leurs deux sites de fixation, les fragments $F(ab')_2$ ont l'avantage d'avoir une plus forte avidité que les fragments monovalents Fab pour les cibles exprimant de nombreuses copies de l'antigène cible, telles que les cellules tumorales.

Les fragments recombinant **scFv** (25 kDa) sont de petites molécules monovalentes composées du domaine variable des chaines lourdes et légères d'une IgG.
Les **diabodies** (50 kDa) sont des molécules bivalantes composées de deux fragments scFv. Il existe également des **triabodies** (75 kDa) et **tétrabodies** (100 kDa).
Les **minibodies** (75 kDa) sont des constructions bivalentes composées des domaines constants $C_H3$ sur lesquels ont été fixés des fragments scFv. Il s'agit donc d'anticorps « raccourcis ». De même, les **scFv-Fc** (100 kDa) sont composés de la région Fc sur laquelle à été fixée deux fragments scFv.

Les **nanobodies** (13 kDa) sont des très petites molécules composées uniquement du domaine de la chaine lourde ou légère d'une IgG humaine ou murine.

Par ailleurs, des **anticorps bi-spécifiques** (bsAbs) sont produits par la fusion de deux hybridomes sécrétant chacun un anticorps spécifique d'une cible différente. Par exemple, ces anticorps peuvent

se lier simultanément à un épitope tumoral et au CD3 d'une cellule T. Cette double spécificité met les cellules T en contact avec la tumeur et induit leur activation partielle à travers CD3.

## 4. Les récentes avancées avec les anticorps immunomodulateurs

L'immunomodulation consiste à bloquer des molécules membranaires impliquées dans la co-stimulation ou son contrôle. Les anticorps immunomodulateurs bloquent des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules effectrices, ou leurs ligands présents sur les cellules cancéreuses ou les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) (Quezada SA, 2013). Ainsi, ces AcM immunomodulateurs ciblent directement le système immunitaire et non pas la tumeur elle-même, contrairement aux AcM traditionnels, aux chimiothérapies et aux immunothérapies classiques.

Le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CD152), présent à la surface des lymphocytes T est un régulateur négatif de leur activation (cf partie I.C.). Il entre en compétition avec le CD28 (régulateur positif) pour se fixer au ligand B7 (B7-1 et B7-2) présent à la surface des APCs, et inhiber ainsi l'activation des lymphocytes T (Leach, 1996). L'ipilimumab (MDX-010, Yervoy®) est un AcM immunomodulateur anti-CTLA-4 capable d'abolir ce mécanisme d'inhibition en bloquant le signal CTLA-4 inhibiteur. Cet AcM humain (IgG1) a été récemment approuvé par la FDA (2011) pour le le traitement du mélanome avancé (non résécable ou métastatique) chez les patient adultes ayant reçu un traitement en situation métastatique. De façon marquante, cet AcM a permis un bénéfice de survie de plus de 2,5 années chez 15 à 20% des patients traités (Hodi FS, 2008, 2010 ; Li B, 2009).

La protéine de mort programmée PD-1 (Programmed Death-1) est une protéine transmembranaire de la famille CD28/CTLA-4, qui est exprimé à la surface des lymphocytes T activés, des lymphocytes B et des macrophages. Comme CTLA-4, la protéine PD-1 est impliquée dans la régulation inhibitrice de la réponse immune contre les cellules tumorales mais avec un mode d'action et des ligands/récepteurs différents (PDL-1, PDL-2 et CD80) (Pardoll D, 2012).
PD-1 se lie au ligand PD-L1 présent à la surface des cellules tumorales, stromales et immunitaires. L'interaction entre PD-1 et son ligand joue un rôle important dans le microenvironnement tumoral en inhibant la production de cytokines et l'activité des cellules T CD4+ et CD8+ infiltrant la tumeur permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. L'équipe de Topalian SL *et al.* a montré que le blocage de PD-1 à l'aide d'un AcM permettait de stimuler la réponse

antitumorale (Topalian SL, 2012). C'est le cas par exemple du nivolumab (BMS-936558, MDX-1106), un AcM humain (IgG4) anti-PD-1 utilisé chez les patients atteints de mélanome ou d'un carcinome à cellules rénales métastatique (Brahmer JR, 2010 ; Topalian SL, 2012).
L'équipe de Brahmer a également observé que le blocage de PD-L1 à l'aide d'un AcM entrainait une régression tumorale durable et une stabilisation de la maladie dans des cancers avancés tels que les cancers pulmonaires non à petites cellules, des mélanomes et les cancers du rein. C'est le cas de l'AcM humain BMS-936559 anti-PD-L1 (Brahmer JR, 2012, 2013).

D'autres anticorps immunomodulateurs sont actuellement en cours de développement préclinique et clinique.

### 5. Caractéristiques de l'antigène cible et de l'AcM

Les AcM utilisés en thérapeutique des cancers sont sélectionnés pour se fixer de façon spécifique à la membrane plasmique des cellules cancéreuses et le moins possible sur les cellules normales, ce qui permet d'éviter les effets néfastes du traitement sur les tissus sains. Ils offrent donc un certain avantage par rapport aux autres formes conventionnelles de thérapie, telle que la chimiothérapie, qui ne permettent pas de discriminer les tissus sains des tissus cancéreux.

L'antigène ciblé doit donc être spécifique de la tumeur avec un niveau d'expression élevé, mais peu d'antigènes de ce type ont été caractérisés jusqu'alors (Christiansen J, 2004), d'où l'importance de la recherche de nouveaux Ag/AcM spécifiques de tumeurs.
L'antigène doit également être exprimé à la surface des cellules tumorales afin d'être accessible aux AcM thérapeutiques, bien qu'il ait été montré l'effet antitumoral d'AcM ciblant une molécule exprimée en intracellulaire, dans trois modèles différents.

## C. Les anticorps monoclonaux anti-Tn

De nombreux anticorps (IgG, IgA et IgM) possédant différentes spécificités fines pour l'antigène Tn ont été générés en utilisant des mucines purifiées issues de surnageants des cellules cancéreuses, des mucines asialiques submaxillaires ovines (OSMs, ovine submaxillar mucins), des extraits tumoraux ou des conjugués Tn synthétiques (Longenecker, 1987; Takahashi, 1988; Numata, 1990; Pancino, 1990; King, 1991; Nakada, 1993; Avichezer, 1997; Reis, 1998; Osinaga, 2000; Schietinger, 2006; Ando, 2008; Danussi, 2009; Li, 2009; Morita, 2009; Welinder, 2011). Ces

anticorps ont pu être utilisés pour la détection du motif Tn par différentes applications, telles que le Western Blot, l'immunohistochimie et la localisation *in vivo* (Danussi, 2009; Osinaga, 1994; Takahashi, 1988). Cependant, il s'avère que les différents anticorps anti-Tn ne donnent pas les mêmes résultats entre eux. Par exemple, dans les cas de tumeurs de la prostate, plusieurs équipes ont évalué l'expression de l'antigène Tn à l'aide d'anticorps anti-Tn. En utilisant l'anticorps 1E3, l'équipe de Zhang S. *et al* (1998) a trouvé que 90% des tumeurs exprimaient l'antigène Tn, l'équipe de Charpin C. *et al* (1992) en a trouvé seulement 20% avec l'anticorps 83D4, et l'équipe de Huang J. *et al* (1992), 50% avec l'anticorps 91S8, et 83% avec le 10F4. Plus tardivement, grâce à la combinaison de plusieurs techniques (immunohistochimie et biopuces glycosidiques), l'équipe de Li Q. *et al.* (2009) a montré que seulement 4 à 26% des tumeurs de la prostate exprimaient l'antigène Tn. Une explication à ces fortes différences pourrait être que les anticorps utilisés pour détecter l'antigène Tn possèdent différentes spécificités fines du motif reconnu, et que certains pourraient avoir des réactions croisées avec d'autres antigènes glycosidiques différents de Tn. Par exemple, divers anticorps anti-Tn présentent une réactivité croisée envers l'antigène sanguin de type A, qui contient un GalNac comme l'antigène Tn (Ando H, 2008). Une telle réactivité croisée peut induire des effets indésirables ou atténuer l'efficacité de l'anticorps, c'est pourquoi l'anticorps à utiliser en thérapeutique doit être très spécifique de l'antigène Tn.

*In vitro*, certains anticorps anti-Tn sont capables de bloquer l'adhérence entre cellules, de médier l'ADCC, et d'autres ont aussi un effet inhibiteur sur la croissance de lignées cellulaires *in vitro* (Morita N, 2009; Welinder, 2011). Par exemple, l'équipe de Danussi *et al.* (2009) a montré *in vitro* la capacité de l'anticorps anti-Tn 2154F12A4 à bloquer l'adhérence des cellules tumorales MCF-7 à des cellules endothéliales lymphatiques en culture.
Deux anticorps anti-Tn, les IgG1 KM3413 et GOD3-2C4, ont été décrits *in vivo* comme induisant une meilleure survie des souris inoculées avec la lignée de cellules tumorales lymphoïdes humaines Jurkat (Ando H, 2008) ou avec la lignée cellulaire humaine de carcinome pulmonaire A549 (Welinder C, 2011) respectivement.

## D. L'anticorps monoclonal chimérique anti-Tn « Chi-Tn »

L'anticorps Chi-Tn étudié ici est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène tumoral Tn (GalNac-*O*-Ser/Thréo), qui reconnaît un groupe d'au moins deux GalNac-*O*-Ser/Thréo présents sur

les protéines de type mucine. Il s'agit d'un AcM chimérique souris/homme, ce qui le rend utilisable *in vivo* chez l'homme.

L'équipe du Professeur Eduardo Osinaga (Institut Pasteur, Faculté de Montevideo, Uruguay) a dans un premier temps produit un AcM murin de type IgM spécifique de l'Antigène Tn (AcM parental 83D4), puis a développé à partir de ce dernier un anticorps chimérique souris/homme (Chi-Tn) dont les fractions variables sont issues de l'IgM murine anti-Tn 83D4, et dont la partie constante correspond au fragment Fc de l'$IgG_1$ humaine (Oppezzo P, 2000). L'AcM Chi-Tn a par la suite été produit et purifié dans notre laboratoire.

L'AcM parental murin IgMκ-83D4 a été produit par un hybridome murin issu de souris BALB/c immunisées avec une suspension cellulaire obtenue à partir de blocks de paraffine de carcinome mammaire invasif humain (Pancino G, 1990). L'AcM 83D4 est réactif contre trois lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7, T47D et H466B), contre des tissus de cancer du sein en paraffine ou congelés, mais n'est pas réactif contre l'épithélium mammaire sain (Pancino G, 1990). Des études immunohistologiques ont montré que l'AcM 83D4 réagissait également contre d'autres carninomes, tels que les adénocarcinomes de l'ovaire, de l'endomètre, du pancréas et du colon (Charpin C, 1992; Osinaga E, 1992). En revanche, l'AcM 83D4 ne réagit pas avec les tissus normaux, mis à par une légère réactivité sur les tissus de colon, d'estomac et d'endomètre. Par test ELISA, il a été montré que l'antigène identifié par l'AcM 83D4 était présent dans des extraits membranaires de la lignée cellulaire mammaire MCF-7, dans les extraits de tissus de carcinomes de sein et de colon, mais également dans les épanchements de fluide pleural issus de patients atteints de cancer du sein métastatique (Pancino G, 1991). Ensuite, il a été montré que l'épitope reconnu par l'AcM 83D4 était l'Ag Tn.

Afin de pouvoir être utilisé *in vivo*, l'AcM murin 83D4 a été cloné et chimérisé en insérant les fragments d'ADN des régions variables $V_H$ (chaine lourde) et Vκ (chaine légère, isotype κ) de l'AcM murin IgMκ-83D4 dans des vecteurs d'expression de mammifère contenant les exons des fractions constantes, γ1 (chaîne lourde) et κ (chaîne légère) des IgG1κ humaines. Le vecteur d'expression a ensuite été transfecté dans la lignée cellulaire de myélome murin X-63 (Oppezzo P, 2000). Les sous-clones les plus productifs ont été selectionnés par dilution limite et cultivés en milieu RPMI complémenté en néomycine et en sérum de veau fœtal (10%). Puis, l'anticorps chimérique Chi-Tn a été purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A-Sépharose à partir des surnageants de culture de la lignée cellulaire X-63 transfectée (la protéine A

est une protéine de la paroi des *Staphylococus aureus*, capable de fixer le fragment Fc des Ig). Enfin, l'AcM Chi-Tn e été déssalé sur colone PD-10 et récupéré en PBS. Les endotoxines ont été éliminées sur membrane E Mustang® (Pall Corporation) (Oppezzo P, 2000).
La réactivité de l'AcM Chi-Tn contre l'antigène Tn a été confirmée par ELISA sur des mucines asialiques submaxillaires ovines (asialo-OSM) et en immuno-fluorescence sur la lignée de carcinome mammaire humain MCF-7 (Tn-positive).

L'affinité de l'AcM Chi-Tn vis-à-vis de glycopeptides Tn synthétiques a été évaluée par la méthode BIAcore (Tokyo, Japon). Celle-ci permet de mesurer les interactions anticorps/antigène et les constantes d'affinité ($K_D$), en utilisant la spectroscopie par résonance plasmonique de surface (SPR, surface plasmon résonance spectroscopy). Pour un glycopeptide contenant deux motifs Tn consécutifs, l'affinité de l'AcM IgG1 Chi-Tn est faible ($2,2 \times 10^{-8}$ M) par rapport à celle de l'AcM IgM parental 83D4 ($3,1 \times 10^{-9}$ M). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un glycopeptide contenant trois motifs Tn consécutifs : la constante d'affinité de Chi-Tn est de $2,1 \times 10^{-8}$ M, et celle de l'AcM parental est de $5,1 \times 10^{-9}$ M (Oppezzo P, 2000).

La présence de la région constante Fc humaine confère à l'AcM Chi-Tn la propriété d'activer la voie classique du système du complément humain. Cette propriété a été évaluée en analysant la capacité de complexes immuns à générer le complexe C5b6 dans un sérum humain déplété en C7 (Oppezzo P, 2000).

## IV. LES MECANISMES D'ACTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Il est difficile de déterminer le mécanisme d'action exact utilisé par les AcM thérapeutiques afin de provoquer une réponse immunitaire anti-tumorale, surtout dans le cas des tumeurs épithéliales. Cependant, il semble que des mécanismes directs (apoptose, blocage de la prolifération cellulaire...) et/ou indirects (lyse tumorale par ADCC et/ou CDC) soient impliqués simultanément.

### A. Effet direct

En plus de ces effets immunologiques indirects, les AcM peuvent induire un effet anti-tumoral par des mécanismes directs. Ils peuvent notamment mimer ou bloquer le ligand naturel d'un récepteur.

Certains AcM agissent en provoquant l'apoptose des cellules cancéreuses, comme par exemple le Rituximab qui active la caspase-3, une enzyme protéolytique qui, sous forme activée, catalyse le clivage spécifique de certaines protéines intracellulaires (Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004). De la même manière, un anticorps anti-CD95 est capable d'activer le récepteur Fas/APO-1 et de déclencher l'apoptose de la cellule.

D'autres AcM bloquent la prolifération des cellules cancéreuses en se fixant sur les récepteurs cellulaires de facteurs de croissance solubles. C'est le cas notamment du Trastuzumab, qui se fixe sur le récepteur HER-2 empêchant la fixation du facteur de croissance EGF et donc la prolifération cellulaire (Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004; Probst A, 2006; Austin CA, 2004).

Cependant, le mécanisme exact d'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* par ces AcM reste peu clair. Une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action à l'aide de modèles murins précliniques permettra de développer de nouveaux schémas thérapeutiques et ainsi d'améliorer leur efficacité *in vivo* chez les patients.

## B. Opsonisation

L'opsonisation de cellules tumorales par un anticorps thérapeutique peut conduire à sa phagocytose par des macrophages ou des neutrophiles. De plus, l'utilisation des AcM facilite la capture et l'internalisation des antigènes tumoraux ou des cellules tumorales par les DC via leurs RFc et augmente par conséquent l'efficacité d'activation et d'expansion des lymphocytes T CD4 et CD8.

Par exemple, l'AcM trastuzumab (anti-Her2) altère la voie de signalisation kinase-dépendante dans la cellule tumorale mais augmente également la présentation de l'antigène grâce à la formation de complexes immuns entre les AcM et leurs cibles, permettant ainsi une meilleure activation de lymphocytes T spécifiques de la tumeur (Wolpoe ME, 2003). Il a d'ailleurs été montré que l'efficacité thérapeutique du trastuzumab nécessitait l'expression des RFc mais aussi la présence de lymphocytes T CD8+ *in vivo* (Park S, 2010).

De même, *in vitro*, l'AcM cetuximab (anti-EGFR) incubé avec des lignées de tumeur du colon permet l'opsonisation des cellules tumorales et donc une meilleure capture par les DC conduisant à une plus forte réponse des lymphocytes T CD8 (Correale P, 2012).

## C. ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity

Lors du mécanisme d'ADCC, la région Fc de l'AcM est reconnue par un récepteur FcγR activateur (FcγRI, FcγRIIIa…) d'une cellule immunitaire effectrice (neutrophile, monocyte/macrophage, cellule NK, éosinophile…), conduisant à l'élimination de la cellule tumorale par lyse ou par phagocytose, suivant le type de cellule effectrice. Les anticorps d'isotype IgG1 et IgG3 sont les plus efficaces pour cette activité d'ADCC.

Ce mécanisme d'ADCC est utilisé par de nombreux AcM thérapeutiques, et constitue un des mécanismes d'action principal de l'AcM Rituximab (Carter P, 2001; Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004; Probst A, 2006), mais aussi du Trastuzumab (Musolino A, 2008), du Cetuximab (Vincenzi B, 2008) ou encore de l'Alemtuzumab. Ces anticorps thérapeutiques sont en effet capables de lyser des cellules cibles cancéreuses en présence de cellules effectrices cytotoxiques.
Les FcγR activateurs sont impliqués dans la réponse antitumorale médiée par les AcM puisque les différentes études dans différents modèles s'accordent sur l'effet des Ac thérapeutiques dépendant de la chaine γ associée aux FcγR murins, FcγRI, FcγRIII et FcγRIV. Toutefois, l'implication relative de ces 3 FcγR activateurs fait toujours débat puisque dans un même modèle de thérapie de mélanome murin par l'Ac TA99, les résultats divergent. Ainsi, le FcγRI et le FcγRIII sont nécessaires mais pas le FcγRIV selon Albanesi *et al.* (Albanesi M, 2012), alors que Nimmerjahn F *et al.* ont montré l'implication du FcγRIV mais pas des FcγRI et FcγRIII (Nimmerjahn F, 2005), et Bevaart L *et al.* concluent que seul le FcγRI est indispensable (Bevaart L, 2006).
En accord avec ces résultats concernant le FcγRI murin, il a été montré que le FcγRI humain (exprimé par des souris déficientes pour les FcγR endogènes murins) est également capable de médier l'effet antitumoral d'une thérapie par AcM contre le mélanome murin (Mancardi DA, 2013).
Parmi ces cellules effectrices, les cellules NK sont très souvent impliquées. Celles-ci expriment des récepteurs FcγRIII (CD16), leur permettant de se lier à une cellule cible opsonisée par des IgG. Les granules cytotoxiques cytoplasmiques, chargés de perforine et de granzyme, sont acheminés jusqu'à la membrane plasmique de la cellule NK et déversés dans l'espace intracellulaire séparant l'effecteur et la cible. En se polymérisant à la surface de la cible, la perforine va créer des pores dans la membrane conduisant à une déstabilisation de la bicouche lipidique et favorisant alors l'entrée de granzymes. Parmi eux, le granzyme B va agir sur la cascade des caspases et entraîner l'apoptose de la cellule cible, tandis que d'autres granzymes vont coopérer et provoquer la mort de la cellule opsonisée.

## D. CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity

Les AcM de certaines classes d'Ig (les IgM, les IgG1 et les IgG3) peuvent déclencher la voie classique d'activation du complément et provoquer la formation de pores dans la membrane cellulaire.

Le complément est un système auxiliaire de l'immunité. Il comprend un ensemble d'environ 30 protéines plasmatiques circulantes et membranaires synthétisées essentiellement par les cellules du foie et les macrophages. Ces protéines interagissent selon une séquence précise, conduisant à générer des molécules effectrices qui jouent un rôle important dans les défenses de l'hôte.

La cascade enzymatique d'activation des protéines du complément est capable d'atteindre une amplification considérable : à partir d'un faible nombre de molécules de complément activées précocement dans la cascade, un grand nombre de molécules effectrices peut être produit.

La voie classique d'activation du complément est déclenchée lorsque des IgM ou certaines sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG3 chez l'homme) se lient à des antigènes, et rendent ainsi leurs régions Fc accessibles aux protéines du complément. Le fragment C1q de la protéine du complément C1 se lie à deux régions Fc adjacentes et devient une enzyme active, entraînant la liaison et le clivage des protéines C4 et C2 pour former un complexe C4b2a. Celui-ci se fixe de manière covalente à l'anticorps et à la surface de la cellule cible où il s'est fixé, et assure les fonctions de C3 convertase. Il dégrade C3, générant à nouveau le C3b qui se fixe de manière covalente à la cellule cible, près du site d'activation. Les cellules recouvertes de C3b sont phagocytées par les macrophages, qui expriment le récepteur du complément du type 1 (CR1 ou CD35) reconnaissant le C3b. Par conséquent, C3b agit comme une opsonine.

Une certaine proportion de C3b se lie au complexe C4b2a et le complexe C4b2a2b qui en résulte agit comme une C5 convertase.

Les étapes finales de l'activation du complément sont initiées par la liaison de C5 à la C5 convertase et par la protéolyse de C5, aboutissant à la formation de C5b. Les autres composants C6, C7, C8 et C9 se lient de manière séquentielle. La dernière protéine de la voie, C9 ou complexe d'attaque membranaire (*Membrane Attack Complex*, MAC), se polymérise pour former un pore dans la membrane cellulaire au travers duquel l'eau et différents ions peuvent pénétrer, provoquant la mort de la cellule par lyse osmotique (Carter P, 2001; Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004; Probst A, 2006).

L'activation de la voie classique du complément libère aussi les facteurs chimiotactiques anaphylatoxiques C3a et C5a, capables de recruter des effecteurs immunologiques antitumoraux (neutrophiles, macrophages…) pro-inflammatoires.

Alternativement, le C1q fixé à l'AcM peut être reconnu par le récepteur C1qR d'une cellule immunitaire effectrice et conduire ainsi à la mort de la cellule cible par lyse ou phagocytose (suivant le type de cellule effectrice) (Carter P, 2001; Smith MR, 2003; Christiansen J, 2004; Probst A, 2006).
Il existe 4 récepteurs du complément : CR1, CR2, CR3 et CR4.
CR1 ou CD35 est exprimé principalement par les érythrocytes, neutrophiles, monocytes et macrophages. CR2 ou CD21 est exprimé principalement par les lymphocytes B mais aussi par certaines cellules T. CR3 ou (CD18/CD11b) et CR4 (CD18/CD11c) appartiennent à la famille des intégrines et sont exprimées sur les cellules de la lignée myéloïde, y compris sur les monocytes, macrophages, polynucléaires et cellules dendritiques.

Par ailleurs, la séquence en acides aminés ou la glycosylation (fucose +/-) du fragment Fc des AcM peut être modifiée afin d'augmenter l'affinité pour les récepteurs FcγR et donc les effets cytolytiques (capacité d'ADCC et de CDC).

## V. LES ANTICORPS COUPLES COMME VECTEURS CYTOTOXIQUES SPECIFIQUES

Les anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement des antigènes ou des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales peuvent être utilisés en immunothérapie afin de vectoriser des radioisotopes, chimiothérapies ou toxines.
Cette approche permet de cibler spécifiquement la tumeur tout en réduisant les effets secondaires sur les tissus sains, et de ce fait, permet éventuellement d'augmenter la dose du composé toxique (Govindan SV, 2010, 2012).
Avec l'approbation par la FDA de deux radioimmuno-conjugués (Zevalin®, Bexar®), de deux immunoconjugué (Adcetris®, Kadcyla®) et avec les nombreux candidats thérapeutiques à différents stades de développement clinique, les immuno-conjugués font régulièrement l'objet de nouvelles approbations règlementaires.

## A. Les anticorps couplés à un élément radioactif : Les radio-immunoconjugués

La radio-immunothérapie (RAIT) implique l'utilisation d'anticorps monoclonaux radiomarqués, permettant une radiothérapie ciblée. L'irradiation continue à faible dose délivrée par l'anticorps radiomarqué fixé aux cellules tumorales conduit à la destruction des cellules cibles.
Il existe deux types de radio-immunothérapie. La première technique consiste à cibler les cellules tumorales à l'aide d'anticorps monoclonaux directement marqués. La seconde technique, dite de « pré-ciblage » (« pretargeting »), consiste dans un premier temps à cibler la tumeur avec un anticorps monoclonal nu, puis dans un deuxième temps à radiomarquer *in vivo* cet anticorps par complexation avec des haptens radiomarqués.

### 1. Couplage direct à un élément radioactif

En radio-immunothérapie, l'anticorps peut être directement couplé à des émetteurs de particules alpha (α) ou beta (β) (Tableau IV).

**Tableau IV: Les principaux radioisotopes émetteurs a et b utilisés en radioimmunothérapie**

| Radionucléotide | $t_{1/2}$ | Emission | $E_{max}$; $range_{max}$ |
|---|---|---|---|
| $^{131}I$ | 8 j | β | 610 KeV ; 2 mm |
| $^{90}Y$ | 64 h | β | 2,3 KeV ; 12 mm |
| $^{177}Lu$ | 6,7 j | β | 496 KeV ; 1,5 mm |
| $^{225}Ac$ | 10 j | α | 6-8 KeV ; 0,06-0,09 mm |
| $^{213}Bi$ | 46 min | α | >6 KeV ; 84 µm |
| $^{211}At$ | 7,2 h | α | 7,5 KeV ; 80 µm |

Un anticorps conjugué à un radio-isotope émetteur β sera cytotoxique dans un rayon de plusieurs cellules. Les particules β peuvent traverser jusqu'à quelques centimètres de tissus et donc transmettre leur énergie au voisinage du point d'émission. Elles seront utilisées pour détruire des tumeurs volumineuses.
Pour l'utilisation avec des anticorps entiers, les beta-émetteurs $^{131}I$, $^{90}Y$ et $^{177}Lu$ sont les plus prometteurs et les plus pratiques. Le $^{90}Y$ est un béta-émetteur de haute énergie avec une demi-vie de 64h, tandis que le $^{131}I$ possède une demi-vie plus longue (8,1 jours) mais une énergie intermédiaire.

Ce dernier n'est pas utilisable dans le cas d'anticorps internalisés, car il est rapidement éliminé des cellules tumorales après le catabolisme intracellulaire de l'anticorps.
Les émetteurs α ont une demi-vie courte et émettent de l'énergie sur une très faible distance. Cela permet de cibler des tumeurs de petit volume et d'épargner les cellules saines immédiatement adjacentes aux cellules tumorales. $^{213}$Bi, $^{225}$Ac et $^{211}$At sont les alpha-émetteurs les plus utilisés.
Les deux composés les plus importants sont le $^{90}$Yttrium-ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®) et le $^{131}$Iode-tositumomab (Bexar®), constitués de radioisotopes couplés à des anticorps monoclonaux murins ciblant l'antigène CD20 et employés dans le traitement des lymphomes non-hodgkiniens (Tableau V).

**Tableau V: Exemples d'anticorps thérapeutiques couplés à un radioisotope**

| | Cible | Indications | Approbation |
|---|---|---|---|
| **Zevalin® ibritumomab Tiuxetan** | CD20 | Lymphome non Hodgkinien | 2002 |
| **Bexar® $^{131}$Iode tositumomab** | CD20 | Lymphome B réfractaire | 2003 |

### 2. Technique de « pré-targeting »

La radio-immunothérapie par pré-targeting permet que la phase de localisation de la tumeur par l'anticorps soit temporairement séparée de l'administration de radionucléides sous forme de petites molécules d'haptènes. Il existe différents formats de pré-targeting, notamment ceux utilisant des anticorps bispécifiques (bsAb) et ceux utilisant une méthode basée sur la streptavidine-biotine.
Dans la première méthode, un anticorps bispécifique nu est d'abord injecté. Après fixation à la tumeur et élimination des Ac non fixés de la circulation, un peptide avec deux fragments d'haptènes et un radionucléide est administré. Un haptène bivalent peut se fixer à 2 anticorps bispécifiques proches à la surface de la cellule tumorale.

Les avantages de l'approche utilisant les anticorps bispécifiques sont qu'elle ne requiert pas d'étape de lavage, et qu'elle n'utilise pas de streptavidine, dont l'immunogénicité peut poser problème.

## B. Les anticorps couplés à une molécule toxique

L'immunothérapie passive par ADC (Antibody-Drug Conjugate) combine la sélectivité prouvée des anticorps monoclonaux à des agents cytotoxiques puissants.

Les ADCs libèrent un agent cytotoxique puissant spécifiquement dans les cellules tumorales cibles, permettant ainsi de limiter l'exposition des tissus sains à la molécule chimique libre, et donc de réduire les effets toxiques des chimiothérapies classiques, tout en améliorant l'activité antitumorale.

A l'heure actuelle, les immunoconjugués constituent l'approche la plus prometteuse parmi les stratégies de ciblage des agents antitumoraux, de nombreux composés étant en développement, dont certains exemples ci-après (Tableau VI) :

**Tableau VI: Exemples d'ADC thérapeutiques**

| | Isotype | Cible | Agent cytotoxique | Espaceur | Indications | Stade clinique |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Kadcyla® Trastuzumab emtansine** | IgG1 | Her2 | DM1 | Thioéther | Cancer du sein | Approuvé en 2013 |
| **Adcetris® Brentuximab vedotin** | IgG1 | CD30 | vcMMAE | Val-Cit | Lymphome hodgkinien | Approuvé en 2011 |
| **Mylotatg® Gemtuzumab ozogamicin** | IgG4 | CD33 | Calichéamycine | Hydrazone | Leucémie myéloïde | Approuvé en 2000 Arrêté en 2010 |
| **Glembatumumab vedotin** | IgG2 | GPNMB | vcMMAF | Val-Cit | Cancer du sein, mélanome | Phase II |
| **SAR3419** | | CD19 | DM4 | Disulfure | Lymphome non hodgkinien | Phase I |

Les ADCs sont composés de trois parties : L'anticorps, le linker, et la molécule toxique. Les dernières générations d'ADCs possèdent des agents cytotoxiques 100 à 1000 fois plus puissants que les composés plus anciens, des linkers plus stables dans la circulation, une technologie de conjugaison améliorée et un ratio d'agent cytotoxique par anticorps optimisé.

Les ADCs ont pour rôle de libérer directement dans la cellule cible une molécule cytotoxique. Pour cela, l'ADC reconnaît et se fixe à son antigène cible exprimé spécifiquement à la surface des cellules tumorales. Le complexe ADC-antigène est alors internalisé dans la cellule cancéreuse par endocytose, puis les vésicules endosomales fusionnent avec les lysozomes, où la molécule toxique est libérée de son anticorps par différents mécanismes, suivant le linker utilisé. L'agent toxique va alors induire la mort de la cellule par apoptose, mais parfois aussi la mort des cellules voisines par transport ou par diffusion dans l'environnement.

De nombreux paramètres doivent être pris en compte afin d'améliorer l'efficacité de l'ADC. Par exemple, chacune des trois parties composant l'ADC peut être optimisée (Sapra P, 2013).
L'anticorps utilisé doit cibler un antigène exprimé spécifiquement par les cellules tumorales pour ne pas affecter les tissus sains. La molécule fixée doit posséder une action cytotoxique puissante. Et

enfin, le linker doit être stable dans la circulation générale, et capable de libérer la molécule toxique une fois internalisé dans la cellule cible.

## 1. Les linkers utilisés

Deux types de linkers sont utilisés : Les linkers clivables et les linkers non-clivables.
Les conjugués avec un linker non-clivable ont l'avantage d'être moins toxiques, car ils doivent d'abord être internalisés dans la cellule cible afin que la molécule toxique soit libérée de l'anticorps. De plus, le métabolite amino-acide (annexé à la molécule toxique, et généré après métabolisme intracellulaire) est incapable de diffuser à travers la membrane plasmique, diminuant ainsi la toxicité sur les cellules voisines.
La liaison thioether est considérée plus stable, car elle résiste au clivage chimique ou enzymatique du milieu extracellulaire, contrairement aux liaisons disulfures qui doivent être clivées suite à des réactions d'échanges thiol-disulfure.
L'introduction d'un agent de liaison (linker) de type peptidique valine-citrulline (Val-Cit) par exemple, confère une meilleure stabilité aux liaisons hydrogène et disulfure. Ce linker est dégradé spécifiquement par la Cathepsine B dans les lysosomes (Sanderson RJ, 2005). Une version tronquée de ce linker dipeptidique contient uniquement le groupement maleimidocaproyl (mc), sans acide aminé, par conséquent décrit comme protéase-résistant et dit non-clivable (Doronina SO, 2006 ; Jackson D, 2008 ; Ryan MC, 2010). L'agent cytotoxique est libéré après que l'ADC ait été internalisé dans la voie d'endocytose de la cellule cible. Il a été montré que ce linker mc est aussi efficace que le linker dipeptidique (mc-Val-Cit) pour conférer au conjugué entre le même AcM et la même molécule toxique une efficacité anitumorale *in vivo* équivalente avec une toxicité réduite concernant les effets secondaires (Doronina SO, 2006).
Ainsi, le linker utilisé doit être fonction des cellules tumorales cibles, de la tolérance de l'organisme à la molécule chimique et de la fenêtre thérapeutique réalisable.

Un linker instable peut être à l'origine de la libération de l'agent cytotoxique à l'extérieur du tissu tumoral cible, et notamment dans la circulation sanguine. Cela résulte en une exposition systémique plus large à l'agent cytotoxique, ainsi qu'en une faible localisation de l'ADC au niveau des cellules tumorales, et donc en une mauvaise activité de l'ADC.

A l'inverse, un linker stable permet d'augmenter la spécificité à la cible, et de réduire la toxicité pour les tissus sains.

Plusieurs conjugués trastuzumab-dérivé de maytansinoide utilisant différents linkers ont été comparés dans des modèles précliniques du cancer du sein à cellules HER2-positives. Il a été montré que le conjugué MCC-DM1 utilisant un linker thioether stable et non-clivable était plus efficace et mieux toléré que le conjugué utilisant un linker disulfure clivable (Lewis Phillips GD, 2008).

## 2. Quelques exemples de molécules toxiques utilisées

La cytotoxicité de la molécule toxique de départ est importante puisque une fois couplée à l'anticorps, une faible quantité du conjugué correspondant sera internalisée dans les tumeurs. Cela est du au fait que la plupart des immunoconjugués possède un faible rapport principe actif/anticorps et que le nombre d'antigènes de surface est un facteur limitant.

Dans le cas où les récepteurs ciblés par l'anticorps sont fortement exprimés par les cellules tumorales, on peut alors coupler l'anticorps à une molécule de cytotoxicité modérée, comme par exemple la Doxorubicine. On peut citer notamment l'utilisation du milatuzumab (hLL1), un anticorps anti-CD74 couplé à la Doxorubicine dans le traitement des modèles précliniques de lymphomes et les myélomes multiples. Le CD74 est une cible de choix car fortement exprimé à la surface des cellules tumorales et très rapidement internalisé puis dégradé dans les lysosomes. Des études cliniques sont en cours d'investigation chez des patients souffrants de myélomes multiples, de leucémie lymphocytaire chronique (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL) ou de lymphome non-Hodgkinien (Non-Hodgking Lymphoma, NHL).

Mais généralement, l'immunothérapie par ADC nécessite l'utilisation de molécules chimiques hautement toxiques (concentration inhibitrice à 50% - $IC_{50}$ - de l'ordre du picomolaire ou subnanomolaire) afin de compenser le faible niveau de localisation de l'anticorps sur le site tumoral. Les molécules hautement toxiques les plus utilisées sont la calichéamycine, le SN-38, les maytansinoides et les auristatines.

### a) La calicheamycine

La calichéamycine est un puissant antibiotique qui se fixe sur le petit sillon de l'ADN des cellules et crée des cassures dans les brins d'ADN conduisant à l'apoptose de la cellule.

Le Gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg®) a été le premier immunoconjugué ADC approuvé par la FDA en 2000 dans le traitement des leucémies myéloïdes aigues (Acute Myeloid Leukemia, AML). Il s'agit d'un anticorps anti-CD33 humanisé (hP67.6) couplé à la calichéamycine par des liaisons hydrazone et disulfure clivables. Cependant, l'utilisation du conjugué a montré qu'il n'apportait aucun avantage en terme de survie, par rapport aux traitements conventionnels. C'est pourquoi le produit a été retiré du marché en juin 2010.
Un autre anticorps couplé avec les mêmes liaisons à la calichéamycine est également en cours d'étude pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens (Non-Hodgking Lymphoma, NHL), dans le cas des leucémies lymphoblastiques aigues à cellules B (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL). Il s'agit de l'Inotuzumab ozogamicine (CMC-544), un anticorps monoclonal anti-CD22 humanisé couplé à la calichéamycine.

### b) Les camptothécines

La camptothécine, est un alcaloïde d'origine naturelle extrait de l'arbre chinois *Camptotheca acuminata*.
Elle possède des propriétés antitumorales intéressantes par inhibition de la topoisomérase I, une enzyme impliquée dans les phases d'élongation et de réplication de l'ADN (provoquant des cassures dans l'ADN). Cependant, elle ne peut être utilisée en clinique en tant que telle, car au-delà de sa faible solubilité aqueuse limitant grandement son administration, elle possède de graves toxicités qui pourraient nuire à la survie du patient (diarrhées, nausées, vomissements, anorexie et surtout cystites hémorragiques).

LE SN-38 est la forme active de l'irinotecan (CPT-11, Camptosar®). Il s'agit d'une pro-drogue dérivée de la camptothécine et utilisée en chimiothérapie systémique des cancers du colon métastasiques et approuvé en Europe en 1995. *In vitro,* la puissance de la molécule active SN-38 est 1000 fois supérieure à celle de la pro-drogue. A l'heure actuelle, le SN-38 est le composé le plus intéressant de la famille des camptothécines et surtout l'un des plus puissants inhibiteurs de topoisomérase I.

### c) Les maytansinoides

Les maytansinoides sont des molécules très puissantes qui agissent sur les cellules en inhibant la polymérisation de la tubuline, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, et à la mort

des cellules. Les maytansinoides peuvent être liés à l'anticorps par pont disulfure ou par liaison thioether.

Par exemple, le conjugué trastuzumab-emtansine (T-DM1, Kadcyla®) est utilisé dans le traitement des cancers du sein métastatiques à cellules HER2-positives, et a été très récemment approuvé par la FDA (22 février 2013). Il s'agit d'un anticorps humanisé IgG1 anti-HER2 (trastuzumab) lié au dérivé de la maytansine DM1 par une liaison thioether stable, non-clivable. En plus des mécanismes d'actions propres au trastuzumab seul, le couplage au DM1 confère au T-DM1 une nouvelle activité antitumorale par libération de puissants catabolites maytansinoides dans la cellule cible (Burris HA, 2011).

### d) Les auristatines

Les dolastines sont des pseudopeptides cytotoxiques naturels extraits de l'organisme marin *Dolabela auricularia*. Ce sont des molécules antimitotiques très puissantes capables d'inhiber de façon très efficace la polymérisation de la tubuline.
L'activité cytotoxique et l'intérêt de la cible biologique des dolastatines ont stimulé le développement et la synthèse de plusieurs molécules apparentées, les auristatines, qui peuvent être préparées en grandes quantités pour des études cliniques et pharmacologiques. Les monométhyl Auristatines E (MMAE) et F (MMAF) sont les dérivés auristatines les plus puissants et les plus prometteurs. Ils sont solubles dans l'eau, stables dans les conditions physiologiques, et ils possèdent des fonctions libres qui permettent de les lier à d'autres entités tels les anticorps, sans pour autant altérer leur cytotoxicité.

Contrairement au MMAE, le MMAF possède au niveau C-terminal une phénylalanine chargée au pH physiologique, qui contribue à diminuer la redistribution passive à travers la membrane plasmique, et donc permettant une accumulation de la molécule toxique dans la cellule cible (Doronina SO, 2006). Les conjugués MMAE contiennent un linker clivable, tandis que les MMAF contiennent un linker non clivable.

Par exemple, le brentuximab vedotin (SGN-35, Adcetris®) est un AcM IgG1 chimérique anti-CD30 (cAC10) couplé au dérivé de l'auristatine MMAE. Il est utilisé dans le traitement du lymphome de Hodgkin (HL) ou lymphome systémique anaplasique à grandes cellules (ALCL). La demande

d'AMM de ce médicament est en cours d'examination par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) depuis Juin 2011, mais le SGN-35 a été approuvé par la FDA en Août 2011 (Deng C, 2013).

## C. Les anticorps couplés à une toxine : Les immunotoxines

Différentes classes de toxines peuvent être conjuguées à des anticorps monoclonaux. Il s'agit en général de toxines issues de bactéries ou de plantes (Tableau VII).

Parmis les toxines bactériennes on peut citer notament l'exotoxine de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique, la toxine de Shiga... Par exemple, le Denileukin diftitox (Ontak®) est une protéine recombinante cytotoxique, combinant une protéine de fusion de l'interleukine 2 humaine à la toxine diphtérique. Il a été approuvé par la FDA en 1999 pour le traitement des lymphomes cutanés à cellules T (Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL). Un autre exemple est le Moxetumomab pasudotox (HA22 ou CAT-8015), une immuno-toxine recombinante composée du fragment Fv d'un anticorps monoclonal anti-CD22 couplé à un fragment de l'exotoxine A de *Pseudomonas* (PE38) (Kreitman RJ, 2011).

Les toxines végétales pouvant être conjuguées à des anticorps sont relativement nombreuses. Il peut s'agir par exemple de la ricine, la saporine, l'agglutinine-1, ... La saporine (SAP), est une protéine issue des feuilles de la plante Saponaire officinale (*Saponaria officinalis)*. Elle agit comme une ARN N-glycosidase et inhibe la synthèse protéique des ribosomes (RIP, Ribosome Inactivating Protein) en clivant l'ADN ribosomal au niveau d'une base adénine spécifique, induisant des dommages irréversibles (Stirpe F, 1992). La saporine a été beaucoup utilisée pour la synthèse d'ADC, car elle possède une activité enzymatique élevée, une bonne stabilité et une résistance aux procédures de couplage et à la dégradation protéolytique (Polito L, 2011).

**Tableau VII: Exemples d'immunotoxines thérapeutiques**

| | Cible | Agent cytotoxique | Indications | Stade clinique |
|---|---|---|---|---|
| **Ontak® denileukin diftitox** | IL2R | Toxine diftérique | Lymphome cutané | Approuvé en 1999 |
| **Cintredekin besudotox** | IL13R | Exotoxine de *Pseudomonas* | Cancer du cerveau | Phase III |
| **LMB-2** | CD25 | Exotoxine de *Pseudomonas* | Leucémie | Phase II |
| **BL22** | CD22 | Exotoxine de *Pseudomonas* | Tricholeucémie | Phase II |

Les principaux effets secondaires observés dans le cas de l'utilisation des immunotoxines sont une très forte toxicité systémique et surtout un syndrome de fuite capillaire (hyperméabilité capillaire) qui serait lié à l'action cytotoxique des toxines sur les cellules endothéliales.

## D. Les anticorps couplés à une cytokine : Les immunocytokines

L'interféron alpha est une cytokine possédant des propriétés immuno-stimulatrices puissantes et des effets anti-prolifératifs sur certains cancers à cellules B, mais son utilité clinique est limitée par sa toxicité systémique et par sa courte demi-vie dans la circulation. C'est pourquoi, l'interféron alpha a été conjugué à des macromolécules tels que les anticorps.
Dans le traitement ciblé des lymphomes à cellules B, une protéine de fusion anti-CD20-INFa a été construite. Le ciblage CD20 à permis d'obtenir des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques efficaces contre les lymphomes B résistants au Rituximab et les lymphomes humains à cellules B (Xuan C, 2010).

## E. Combinaison de thérapies

Comme en chimiothérapie, il est possible de combiner différentes thérapies ciblées. Cela permet notamment d'augmenter l'efficacité du traitement en ciblant différents marqueurs de la cellule tumorale et en utilisant différents mécanismes d'action.
Par exemple, il est possible d'associer une radioimmunothérapie par le $^{90}$Y-epratuzumab tetraxetan (anti-CD22 humanisé) avec une immunothérapie par le valtuzumab (anti-CD20 humanisé nu) dans le traitement des lymphomes B dans un modèle de souris Nude (Mattes MJ, 2008).

# RESULTATS EXPERIMENTAUX

L'antigène Tn est exprimé à la surface des cellules tumorales dans environ 90% des cancers épithéliaux humains (ovaire, sein, prostate, colon, pancréas…) et dans certains cas de cancers hématologiques, tandis qu'il n'est pas détecté dans les cellules normales. Cet antigène spécifique des tumeurs représente donc une cible très intéressante pour l'immunothérapie passive par anticorps.

De nombreux anticorps possédant différentes spécificités fines pour l'antigène Tn ont été générés par différents groupes, surtout pour des applications concernant la détection de l'antigène Tn. Les AcM anti-Tn possèdent l'avantage de cibler uniquement les cellules tumorales, car l'antigène Tn est un antigène très spécifique des tumeurs, contrairement à de nombreux AcM thérapeutiques ciblant une protéine surexprimée dans les cancers, et donc pouvant entraîner des effets indésirables sur les cellules normales. *In vitro*, certains anticorps anti-Tn sont capables de bloquer l'adhérence entre cellules, de médier l'ADCC, et d'inhiber la croissance de lignées cellulaires tumorales. Cependant, seulement deux de ces anticorps anti-Tn ont été décrits comme induisant un effet thérapeutique *in vivo* chez la souris dont l'un a été publié seulement en 2011, parallèlement à notre premier article (Hubert *et al.* 2011). Il s'agit des IgG1 anti-Tn cKM3413 et GOD3-2C4, qui ont été décrites *in vivo* comme induisant une meilleure survie des souris inoculées avec la lignée tumorale humaine lymphoïde Jurkat (Ando H, 2008) ou une lignée de carcinome pulmonaire (Welinder C, 2011) respectivement. Toutefois, l'effet de l'AcM cKM3413 n'a été montré que pour une lignée lymphoïde T et ne présage en rien de l'efficacité de cet AcM pour d'autres types de tumeurs. Par ailleurs, le contrôle de la croissance tumorale de la lignée A549 par l'AcM GOD3-2C4 n'est que très partiel. Ainsi, la cible Tn étant particulièrement attrayante pour une immunothérapie par anticorps, l'étude et le développement préclinique d'un nouvel AcM anti-Tn s'avérait être intéressante. L'AcM Chi-Tn représente donc un candidat potentiel pour l'immunothérapie passive des cancers exprimant l'antigène Tn, ce que je me suis attachée à étudier au cours de ma thèse.

Les AcM chimériques et humanisés présentent de nombreux avantages en immunothérapie passive par anticorps chez l'homme, par rapport aux anticorps murins: en effet, ils permettent notamment d'augmenter l'activité biologique, en améliorant la demi-vie de circulation et en réduisant l'immunogénicité chez l'homme. L'AcM Chi-Tn que nous avons utilisé ici est un anticorps chimérique homme/souris, permettant une utilisation directe chez l'homme, tout comme l'AcM

cKM3413 (décrit plus haut), induisant un effet thérapeutique *in vivo* chez la souris dans le cas d'un lymphome T Jurkat (Ando H, 2008).

Les AcM thérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer peuvent être utilisés « nus » afin d'inhiber directement la croissance tumorale par un mécanisme d'apoptose et/ou indirectement, en stimulant le système immunitaire. Ils peuvent également être utilisés en tant qu'immunoconjugués, afin de délivrer spécifiquement une molécule cytotoxique dans les cellules tumorales, sans affecter les tissus sains. A ce jour, aucune publication ne mentionne l'utilisation d'un anticorps anti-Tn sous forme d'immunoconjugué.
Lors de ma thèse, j'ai exploré la possibilité d'utiliser l'AcM Chi-Tn à travers ces deux stratégies thérapeutiques.

Les objectifs de ma thèse sont de décrire le mécanisme d'action de l'AcM Chi-Tn *in vitro* et *in vivo*, et d'évaluer son efficacité en immunothérapie passive par anticorps, ainsi que la potentialité de son utilisation chez l'homme.
Dans cette partie du manuscrit seront présentés les travaux résultants de mon travail de thèse.

- Un premier article porte sur l'étude de l'effet thérapeutique de l'anticorps chimérique Chi-Tn (en association avec la cyclophosphamide) chez la souris porteuse de cellules de carcinome mammaire TA3Ha. Ce travail décrit le mécanisme d'action de type ADCC de l'anticorps Chi-Tn, notamment le rôle joué par les récepteurs FcγR dans l'effet thérapeutique, l'existence de conjugués stables entre les cellules tumorales et les cellules effectrices, avec la présence de zones de contact assimilables à des synapses immunologiques. Bien que le mécanisme d'ADCC de certains AcM thérapeutiques ait déjà été montré *in vitro* (Ando H, 2008; Welinder C, 2011), cet article est le premier à montrer un mécanisme d'ADCC *in vivo* chez la souris, avec la visualisation de « synapses-ADCC ».

- Dans un second article, nous avons exploré pour la première fois la possibilité d'utiliser un anticorps anti-Tn comme vecteur d'agents cytotoxiques. Après avoir montré que l'AcM Chi-Tn est capable de cibler spécifiquement les cellules tumorales *in vivo*, et qu'il est rapidement internalisé dans les endosomes précoces et de recyclage *in vitro*, l'AcM Chi-Tn a été couplé à la Saporine et à l'Auristatine F, et son efficacité, sous forme de conjugué, a été testée *in vitro*.

# I. ACTIVITE ANTITUMORALE DE L'ANTICORPS CHI-TN ET MECANISMES D'ACTION

## A. Résumé de l'article 1

Titre: **Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy.**

Pascale Hubert, Adèle Heitzmann, Sophie Viel, André Nicolas, Xavier Sastre-Garau, Pablo Oppezzo, Otto Pritsch, Eduardo Osinaga and Sebastian Amigorena.

*Cancer Research*, 2011, 71(15), 5134-43.

**Introduction**

Les anticorps monoclonaux (AcM) thérapeutiques ciblant spécifiquement des antigènes de surface associés aux tumeurs, suscitent actuellement un intérêt croissant et un développement intensif, mais le mécanisme d'action par lequel ils inhibent la croissance tumorale est encore mal connu.

La plupart des AcM possèdent des effets anti-tumoraux directs, induisant l'apoptose ou bloquant la signalisation de certains récepteurs. Mais les AcM thérapeutiques peuvent également détruire indirectement les cellules tumorales en mobilisant les cellules effectrices du système immunitaire. Le mécanisme d'ADCC semble notamment jouer un rôle majeur dans l'immunothérapie des cancers par anticorps. En effet, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, le rejet des tumeurs nécessite la présence de récepteurs Fc activateurs aux IgG (FcγR) fonctionnels. Cependant, ce phénomène n'a pas été directement démontré *in vivo*.

Dans cet article, nous avons étudié le mécanisme de l'ADCC dans l'immunothérapie des cancers par anticorps, dans un modèle syngénique de tumeur murine. Nous avons utilisé les propriétés de l'AcM chimérique Chi-Tn, reconnaissant spécifiquement l'antigène glycopeptidique Tn à la membrane plasmique d'une large variété de cellules tumorales épithéliales, tandis qu'il n'est pas détecté dans les cellules normales, et cela, aussi bien chez l'homme que chez la souris.

**L'AcM Chi-Tn n'affecte pas la viabilité et la prolifération des cellules tumorales *in vitro***

*In vitro*, l'AcM Chi-Tn ne montre pas de toxicité directe contre les lignées cellulaires de carcinome, ce qui rend possible l'analyse des effets antitumoraux médiés par le système immunitaire de cet anticorps.

**L'AcM Chi-Tn inhibe la croissance des cellules tumorales *in vivo* par un mécanisme dépendant des récepteurs FcγR**

*In vivo*, la lignée Tn-positive de cellules tumorales mammaires murines TA3Ha greffée intra-péritonéalement est rejetée dans plus de 80% des souris Balb/c immunocompétentes après traitement avec une dose unique de cyclophosphamide (CTX) et deux injections hebdomadaires de l'AcM Chi-Tn (au total, 6 injections à 20 mg/kg). Le rejet de la tumeur *in vivo* est aboli chez les souris FcRIIb$^{-}$ déficientes pour la chaîne γ des récepteurs Fc, qui ne possèdent donc pas de récepteurs FcγR activateurs, démontrant un rôle indispensable de ces derniers pour l'effet antitumoral de l'AcM, et suggérant un mécanisme d'ADCC.

***In vivo*, les cellules tumorales forment des conjugués avec les cellules effectrices**

Les cellules tumorales TA3Ha se multiplient en suspension dans la cavité péritonéale, et peuvent être facilement récupérées avec les cellules du microenvironnement, pour être étudiées par microscopie 3D à déconvolution. Nous avons pu observer que les cellules TA3Ha forment des conjugués stables avec des cellules hématopoïétiques présentes dans l'infiltrat péritonéal des souris injectées CTX+Chi-Tn, mais pas des souris injectées avec la CTX et l'anticorps contrôle Herceptine, 4h après l'injection d'anticorps.

Dans notre modèle, les cellules tumorales forment des conjugués avec des macrophages (F4/80$^{+}$), des neutrophiles (Ly6G$^{+}$), mais aussi des lymphocytes B (CD19$^{+}$), à fréquence relativement équivalente. En revanche, nous ne détectons pas de conjugués avec des lymphocytes T ou des cellules NK.

**Les zones de contact sont organisées en SMACS**

La projection orthogonale des images de microscopie révèle que la zone de contact entre les cellules effectrices de l'ADCC et les cellules tumorales est organisée en clusters d'activation supra-moléculaire (Supra-Molecular Activation Clusters, SMACs), de la même façon que les synapses immunologiques des lymphocytes T. Au niveau de cette zone de contact, le réseau de F-actine forme un anneau dans lequel les récepteurs FcγRIII se concentrent. De plus, l'accumulation de

protéines tyrosine phosphorylées à l'interface, ainsi que la polarisation des vésicules LAMP-1$^+$ à proximité de la zone de contact, suggèrent que des signaux d'activation sont transduits, et que ces structures représentent un nouveau type de synapse immunologique multifocale entre les effecteurs de l'immunité innée et les cellules tumorales, que nous appelons « synapse-ADCC ».

Curieusement, ces « synapses-ADCC » sont également observées dans les conditions expérimentales où aucun effet antitumoral n'a été observé, notamment dans le cas des souris déficientes en FcγR activateur après traitement CTX+Chi-Tn, ou bien des souris WT traitées avec l'AcM Chi-Tn en l'absence de CTX. Ainsi, le « cross-linking » de l'AcM Chi-Tn avec le FcγR n'est pas suffisant pour éliminer les cellules tumorales TA3Ha *in vivo*. L'activation des cellules effectrices est nécessaire pour l'élimination des cellules tumorales par ADCC dépendante de la chaine γ des récepteurs FcR.

**Conclusion**

Ainsi, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn spécifique des tumeurs Tn-positives, en association avec la CTX, inhibait la croissance des cellules tumorales *in vivo* par un mécanisme d'ADCC. Notre travail est donc en accord avec les précédentes études qui suggèrent que l'ADCC est impliquée dans les réponses antitumorales dépendantes des anticorps (Clynes RA, 2000; Minard-Collin V, 20008; De Haij S, 2010; Cartron G, 2002). Mais notre travail montre également pour la première fois la présence de synapses-ADCC *in vivo* entre les cellules tumorales et les cellules effectrices.

## B. Article 1

**Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy.**

Pascale Hubert, Adèle Heitzmann, Sophie Viel, André Nicolas, Xavier Sastre-Garau, Pablo Oppezzo, Otto Pritsch, Eduardo Osinaga and Sebastian Amigorena.

*Cancer Research*, 2011, 71(15), 5134-43.

L'article est consultable à l'adresse internet suivante :

http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/15/5134

## C. Résultats supplémentaires

**Matériel et méthode**

Les souris BALB/c ont été greffées en i.p. avec $10^6$ cellules tumorales TA3Ha-GFP (en vert), puis ont été injectées le lendemain (J1) avec 50 mg/kg de CTX en i.p. A J2, les souris ont été traitées i.p. avec 20 mg/kg d'AcM Chi-Tn ou de trastuzumab (Ac contrôle). 5h, 24h ou 48h après l'injection d'anticorps, les cellules péritonéales ont été récupérées, puis mises à adhérer sur lamelle, fixées et perméabilisées. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps dirigé contre la chaîne gamma des récepteurs Fc (en rouge), puis avec un anticorps secondaire approprié. Les cellules ont enfin été marquées au DAPI (en bleu), et les images ont été acquises à l'aide d'un microspcope 3D à déconvolution.

**Résultats et discussion**

Dans cet article, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn est capable d'induire *in vitro* la lyse par un mécanisme d'ADCC des cellules tumorales TA3Ha en présences de macrophages RAW. *In vivo*, l'AcM Chi-Tn, associé à la CTX, inhibe la croissance des cellules TA3Ha par un mécanisme impliquant les récepteurs Fcγ activateurs donc probablement par ADCC. Nous avons de plus mis en évidence l'interaction directe des cellules tumorales *in vivo* avec des effecteurs du système immunitaire formant des synapses avec des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes B après injection de l'Ac spécifique anti-Tn. Les synapses ont été observées 4h après l'injection de Chi-Tn dans les souris.

Dans cette expérience supplémentaire non publiée, nous avons étudié par microscopie le microenvironnement tumoral sur une cinétique plus longue (48h), dans un modèle de souris greffées avec des cellules TA3Ha-GFP, et traitées avec de la CTX et l'AcM Chi-Tn ou l'anticorps contrôle. Comme nous le montre la figure S7, chez les souris traitées CTX+Chi-Tn, le nombre de cellules TA3Ha-GFP diminue au cours du temps jusqu'à être quasiment absentes du microenvironnement tumoral deux jours après l'injection de l'AcM Chi-Tn. Dès 5h après l'injection d'anticorps, on observe des contacts entre les cellules tumorales GFP et les cellules effectrices possédant la chaine γ des récepteurs Fc. Il pourrait s'agir par exemple de macrophages, de cellules NK, de neutrophiles ou de cellules dendritiques, qui possèdent des RFcγ activateurs. Visuellement, plusieurs types cellulaires différents semblent intervenir, et certaines des cellules ont un profil

similaire à des macrophages. D'après les résultats obtenus précédemment pour les synapses à 4h (Figure 5.C), il pourrait s'agir effectivement de macrophages, mais également de neutrophiles. 48h après l'injection d'anticorps, on peut observer la présence de débris cellulaires GFP+ à l'intérieur des cellules effectrices possédant la chaine γ des récepteurs Fc, suggérant que ces cellules (plus nombreuses qu'à 5h) participent à la destruction et à l'élimination des cellules tumorales. Visuellement, la plupart de ces cellules effectrices porteuses de récepteurs RFcγ activateurs possèdent un profil similaire à des macrophages, mais il pourrait également s'agir de neutrophiles qui possèdent également des RFcγ activateurs et sont capables de phagocyter des cellules opsonisées ou des débris cellulaires. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience à 48h en identifiant les différents effecteurs cellulaires par différents marquages spécifiques, comme cela a été réalisé précédemment sur les synapses à 4h.
En revanche, dans les souris contrôle traitées avec la combinaison CTX + Ac contrôle, le nombre de cellules TA3Ha-GFP augmente au cours du temps, suggérant une prolifération tumorale, et aucun débris cellulaire n'est observé dans le microenvironnement.

Ainsi, ces résultats montrent que les effecteurs du système immunitaire sont rapidement actifs pour dégrader les cellules tumorales qui ont été en contact avec l'AcM et capturer ensuite les débris de ces cellules mortes. Il serait intéressant d'identifier si ces deux étapes sont réalisées par les mêmes cellules immunitaires ou bien si elles résultent d'une succession d'évènements impliquant des cellules différentes. Par exemple, est-ce que les macrophages agissent seuls pour détruire et phagocyter les cellules tumorales, est-ce qu'ils agissent en collaboration avec les neutrophiles (ADCC par les neutrophiles, puis phagocytose des débris par les macrophages)… ? De nombreuses questions restent encore à élucider.
Ces résultats supplémentaires permettent également d'illustrer les résultats des expériences de survie *in vivo* menées chez la souris (Figure 3.A), montrant que le traitement permet d'éliminer rapidement les cellules tumorales et donc aux souris de survivre. Mais pour que le traitement soit efficace, il doit être initié rapidement après l'injection des cellules tumorales, avant que celles-ci n'aient eu le temps de proliférer (Figure 3.B).

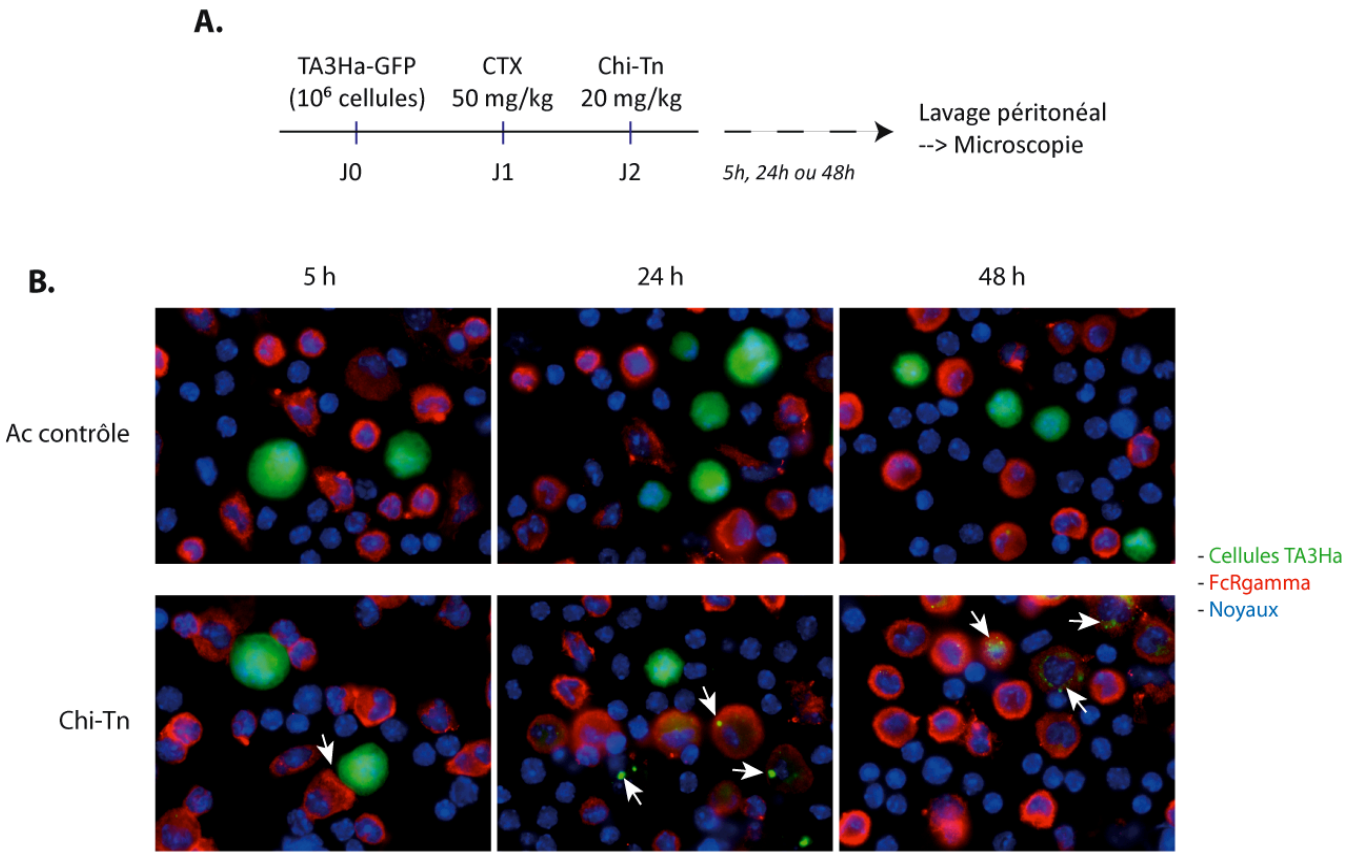



**Figure supplémentaire : Elimination des cellules tumorales TA3Ha *in vivo***

A J0, les souris BALB/c ont été greffées en i.p. avec des cellules tumorales TA3Ha-GFP ($10^6$/souris). La CTX (50 mg/kg) a été injectée à J1, et l'AcM Chi-Tn ou l'Ac contrôle (trastuzumab) a été injecté à 20 mg/kg à J2. 5h, 24h ou 48h après l'injection d'anticorps, les cellules péritonéales ont été récupérées, puis marquées avec un anticorps dirigé contre la chaîne gamma des récepteurs Fc (rouge) et du DAPI (bleu). Vert : cellules TA3Ha-GFP. Une expérience représentative est montrée.

## II. L'ANTICORPS CHI-TN COMME VECTEUR D'AGENTS CYTOTOXIQUES

### A. Résumé de l'article 2

Titre: **A Tn-specific antibody-drug conjugate inhibits tumor growth *in vitro* after uptake in early endosomes.**

Adèle Heitzmann, Christine Sedlik, Rafik Ait Sarkouh, Sophie Viel, Cornélie Batisse, Frédéric Schimdt, Eduardo Osinaga, Pascale Hubert and Sebastian Amigorena.

*(article en fin de rédaction)*

**Introduction**

Les anticorps monoclonaux (AcM) utilisés dans le traitement du cancer suscitent actuellement un intérêt croissant et un développement intensif. Ces AcM thérapeutiques peuvent être utilisés « nus » afin d'inhiber directement la croissance tumorale par un mécanisme d'apoptose et/ou indirectement, en stimulant le système immunitaire. Mais ils peuvent également être utilisés en tant qu'immunoconjugués, afin de délivrer spécifiquement une molécule cytotoxique dans les cellules tumorales, sans affecter les tissus sains. Pour cela, certaines caractéristiques sont requises : une bonne expression de l'antigène cible sur les cellules tumorales, une bonne sélectivité pour la tumeur, ainsi qu'une internalisation des complexes immunoconjugué/antigène afin de libérer la molécule toxique.

Dans cet article, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn, spécifique de l'antigène Tn, se fixe à la surface des cellules tumorales et est internalisé rapidement dans les endosomes précoces et de recyclage. Il peut donc être utilisé comme vecteur pour cibler spécifiquement des molécules toxiques dans la tumeur. Nous avons couplé l'AcM Chi-Tn soit à la saporine, soit à l'auristatine F, et nous avons montré que l'immunoconjugué est capable d'inhiber spécifiquement la prolifération des cellules Tn-positives *in vitro*.

**L'anticorps Chi-Tn se fixe à l'antigène Tn présent à la surface des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo***

*In vitro*, l'AcM Chi-Tn reconnait spécifiquement l'antigène Tn présent à la membrane plasmique des lignées cellulaires tumorales humaines Jurkat, Shin-3 et OvCar-3, et de la lignée tumorale murine TA3Ha, avec une intensité variable suivant la lignée. Par exemple, les cellules de carcinome ovarien, Shin-3 et OvCar-3, fixent l'AcM Chi-Tn avec une intensité moindre que les cellules de lymphome T Jurkat. Ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus par cytométrie de flux quantitative, qui montrent que l'antigène Tn est fortement exprimé par les cellules Jurkat en comparaison aux cellules Shin-3 et OvCar-3 (environ $5 \times 10^5$ et $6 \times 10^4$ molécules Tn par cellule, respectivement).

*In vivo*, des expériences de biodistribution dans un modèle murin de tumeur solide sous-cutanée Shin-3 ont montré que l'AcM Chi-Tn est capable de cibler spécifiquement les cellules tumorales, tandis qu'il ne se fixe pas aux tissus sains. Ainsi, l'AcM Chi-Tn pourrait être utilisé comme vecteur afin de délivrer des molécules cytotoxiques dans les zones tumorales.

***In vitro*, l'anticorps Chi-Tn est rapidement internalisé dans les endosomes précoces et de recyclage**

Nous avons montré par cytométrie de flux que l'AcM Chi-Tn se fixe à l'antigène Tn présent à la surface des cellules cancéreuses et que la quantité d'AcM Chi-Tn fixé à la membrane diminue au cours du temps à 37°C. L'observation des cellules par microscopie 3D à déconvolution permet de constater que l'AcM Chi-Tn est rapidement internalisé dans les cellules tumorales, où il est ciblé dans les endosomes précoces et dans les endosomes de recyclage pendant un temps relativement long d'au moins 4 heures. En revanche, l'AcM Chi-Tn n'est pas détecté dans les endosomes tardifs / lysosomes, même après 4h d'incubation à 37°C.

**L'anticorps Chi-Tn couplé à la saporine ou à l'auristatine F inhibe la croissance des cellules tumorales *in vitro***

Il a été décrit précedement (Hubert P, 2011) que l'AcM Chi-Tn seul n'inhibait pas la prolifération des cellules Tn-positives Jurkat et TA3Ha *in vitro*.

L'AcM Chi-Tn a dans un premier temps été couplé à la saporine (SAP), une toxine végétale inactivant les ribosomes. Nous avons montré que le conjugué Chi-Tn/SAP est capable d'inhiber *in vitro* la croissance des cellules Tn-positives Jurkat et TA3Ha après 3 jours de traitement. En revanche, le conjugué Chi-Tn/SAP n'a pas d'effet toxique sur les cellules ovariennes OvCar-3 et Shin-3, de même que la SAP seule, suggérant que ces dernières sont résistantes à la toxine.

Dans un deuxième temps, nous avons couplé l'AcM Chi-Tn à la monométhyl-auristatine F (MMAF), un agent antimitotique puissant bloquant la polymérisation de la tubuline. Les expériences *in vitro* montrent que le conjugué Chi-Tn/MMAF inhibe la prolifération des cellules Tn-positives Jurkat, mais pas celle des cellules Tn-négatives SKBR3. Ainsi, ces résultats montrent que le Chi-Tn/MMAF est un conjugué efficace pour cibler une molécule citotoxique dans les cellules exprimant l'antigène Tn.

**Conclusion**

Ces expériences nous ont permis de caractériser le mécanisme d'internalisation de l'anticorps Chi-Tn dans les cellules tumorales Tn-positives, et d'étudier l'effet antitumoral de cet anticorps une fois couplé à une molécule toxique. Nos résultats montrent pour la première fois l'utilisation d'un anticorps anti-Tn en tant qu'immunoconjugué. Des expériences chez la souris sont actuellement en cours afin de déterminer l'effet antitumoral *in vivo* du conjugué Chi-Tn/MMAF.

## B. Article 2

**Title: A Tn-specific antibody-drug conjugate inhibits tumor growth *in vitro* after uptake in early endosomes**

By: Adèle Heitzmann [1,2,3], Christine Sedlik [1,2,3], Rafik Ait Sarkouh [1,4], Sophie Viel [1,2,3], Cornélie Batisse [1,4], Frédéric Schimdt [1,4], Eduardo Osinaga [5,6], Pascale Hubert [1,2,3] and Sebastian Amigorena [1,2,3]

[1] Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75005 France.
[2] INSERM, U932, Paris, F-75005 France.
[3] Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 507, Institut Curie, Paris, F-75005 France.
[4] UMR 176, Paris, F-75005 France.
[5] Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
[6] Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

This work was supported by fundings from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Institut Curie; the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Emergence program); the Institut National du Cancer (INCa).

Corresponding authors: Sebastian Amigorena INSERM U932, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France. Phone: 33 1 56 24 67 11; Fax: 33 1 44 07 07 85;
E-mail: sebastian.amigorena@curie.fr

Running title: Tn-specific mAb-drug conjugate in tumour immunotherapy

Keywords: Tn antigen, monoclonal antibody-drug conjugate, immunotherapy, MMAF, epithelial tumours, internalization, immunotoxin, biodistribution

**ASTRACT**

The antibody-drug conjugate (ADC) technology, combining the specificity of tumor recognition by monoclonal antibodies (mAb) and the potent cytoxicity of anti-cancer drugs, is currently under growing interest and development. Tn is a glyco-peptidic tumor-associated antigen expressed in human carcinomas, and poorly detected in normal tissues. Chi-Tn is a mouse/human chimeric mAb that binds specifically to Tn determinants expressed on tumor, but not on normal, epithelial cells. We now show, using flow cytometry and deconvolution microscopy, that the Chi-Tn mAb is rapidly internalized and targeted to early and recycling endosomes. Even after 4h, we failed to visualize the mAb in late endosomes or lysomes. The Chi-Tn mAb conjugated to two different cytotoxins (saporin or auristatin F) inhibits the growth of Tn-expressing tumor cells *in vitro*, while Tn-negative tumor cell proliferation is not affected. Therefore, efficient endocytosis and targeting to early endosomes through Tn targeting is sufficient to produce tumor cell death *in vitro*.

## INTRODUCTION

Over the last two decades, monoclonal antibody (mAb) therapy was established as an effective treatment against cancer (Adams, 2005 / Vacchelli, 2013). Therapeutic mAbs can be used as naked antibodies, inhibiting tumor growth directly by inducing apoptosis upon binding to their specific antigen, and/or indirectly by stimulating the immune system. In addition, antibodies recognizing targets/receptors expressed at the surface of malignant cells can be used as antibody-drug conjugates (ADC) to target potent cytotoxic agents selectively to the tumors without affecting the neighboring healthy cells. The challenge for ADC strategies is to provide better antitumor efficacy with reduced adverse toxicity (Govindan, 2012).

Antibodies can be conjugated to plants or bacterial toxins (ricin, saporin or diphteria toxin and pseudomonas exotoxin A, respectively), to radioisotopes (beta emitters $^{90}$Y and $^{131}$I, or alpha-particles $^{213}$Bi and $^{211}$At), to anti-cancer chemotherapies (doxorubicin, methotrexate or vinblastin), and to toxic drugs or their derivatives, such as calicheamicin (causing double-strand DNA breaks), auristatins and maytansines (inhibitors of microtubule assembly) or a-amanitin (inhibitor of RNA polymerase II) (Govindan, 2010 / Flygare, 2013).

Several requirements need to be fulfilled for a mAb to be used as an ADC, including high expression of its target cell surface antigen, high tumor selectivity, and internalization of antigen-ADC complexes into the cancer cell where the drug will be active (Chari, 2008 / Teicher, 2009). Upon ligand binding, membrane receptors are internalized within early endosomes. Some receptors are then recycled back to the cell surface, while others are sorted into late endosomes and lysosomes where degradation occurs (Sorkin, 2002 / Maxfield, 2004 / Van der Goot, 2006 / Falguières, 2009).

Conjugation of drugs to targeting antibodies is designed according to the subcellular compartment reached by the ADC after internalization into the cell, so that the drug can be released from the carrier under an active form (Bareford, 2007). Thus, to facilitate the drug release within early endosomes, pH-sensitive linkers (for example acid-labile bonds such as hydrazide) have been incorporated between the drug and the mAb, leading to conjugates stable at pH = 7.4 in the blood, and cleaved at pH = 5 in endosomes (Ulbrich, 2004 / Hrubý, 2005 / Chari, 2008). Alternatively, other linkers such as disulfide and thioether conjugates, or dipeptide linkers have been generated that are cleaved inside the lysosomes, while releasing an intact drug moiety (Erickson, 2006 / Chari, 2008). Drugs can be also attached to the mAb through the non-cleavable maleimidocaproyl linker (mc), which is a shorter linker derived from the maleimidocaproyl-Valine-Citrulline (mc-Val-Cit). The use of the mc linker to conjugate drug and Ab led to *in vivo* antitumor effect for the resulting

ADC as effective as the use of mc-Val-Cit while this latter linker was shown to be cleaved by cathepsin B in lysosomes to release the drug (Doronina, 2006 / Jackson, 2008). Identifying tumor-specific surface proteins that are efficiently internalized and drive their ligands to the appropriate endosomes for drug delivery is a major challenge for the development of effective cancer ADCs.

Tn (CD175) is a tumor-associated carbohydrate antigen composed of a N-Acetyl-Galactosamine sugar (GalNac) linked by O-glycosylation to serine or threonine amino acids, mainly in mucin-type glycoproteins (Springer, 1984 / Ju, 2011). Tn antigen is normally cryptic in mucin-type O-glycans and becomes expressed at the surface of tumor cells because of alterations along the O-glycosylation pathways, resulting in defective elongation of carbohydrate chains. Importantly, Tn is highly expressed in various epithelial cancers (primarily ovarian, breast, prostate, colorectal, and lung cancers), and virtually absent in normal tissues (Itzkowitz, 1989 / Pancino, 1990 / Beuzelin-Yvraut, 1995 / Croce, 2001 / Ju, 2002 / Ju, 2008 / Li, 2009 / Hubert, 2011). Moreover, the Tn antigen is involved in the adhesion of tumor cells to the lymphatic endothelium, and Tn-antigen expression seems to correlate with metastatic potential and poor prognosis (Itzkowitz, 1989 / Danussi, 2009 / Ju, 2011). Thus, these data suggest that the Tn-antigen may be a good target for therapeutic antibody.

Several anti-Tn mAbs with different fine specificity for the Tn antigen have been generated (Nakada, 1993 / Avichezer, 1997 / Osinaga, 2000 / Schietinger, 2006 / Ando, 2008 / Danussi, 2009 / Li, 2009), and two of them were reported to induce a better survival of mice inoculated with Jurkat tumor cell line (Ando, 2008) or a lung carcinoma cell line (Welinder, 2011). However, none of these antibodies have been validated for their use as an antibody-drug conjugate. In a previous work, we demonstrated that naked Chi-Tn mouse/human IgG1 chimeric anti-Tn mAb (Oppezzo, 2000) was able to prevent *in vivo* the growth of TA3Ha mammary murine cell line and this effect was dependent on activating-FcγRs (Hubert, 2011).

In this study, we demonstrated that the same mAb Chi-Tn can be used as an ADC to selectively target cytotoxic molecules into tumor cells. Chi-Tn was conjugated either to saporin or to auristatin F. In this latter case, Chi-Tn was conjugated to the monomethyl auristatin F (MMAF) through the noncleavable maleimidocaproyl linker (Doronina, 2006). We show that the naked Chi-Tn mAb is effectively and rapidly internalized and reaches early, but not late, endocytic compartment *in vitro*. *In vivo*, Chi-Tn mAb accumulates selectively within a solid tumor. Two different Chi-Tn ADCs are cytotoxic to Tn-positive, but not to Tn-negative tumor cells *in vitro*. Hence, early endosome delivery is sufficient for effective tumor cytotoxicity *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells

TA3Ha (murine breast cancer, kindly given by C. Leclerc, Institut Pasteur, Paris, France), Jurkat (human T-lymphoid leukemia), OvCar-3 and Shin-3 (human ovarian carcinomas) and SKBR3 (human breast adenocarcinoma) cell lines were cultured in RPMI 1640 (Gibco) containing Glutamax and 10% fetal calf serum (FCS). EL-4 (murine T-lymphoid leukemia) cells were cultured in the same medium supplemented with β-2-mercaptoethanol (Gibco).

### Antibodies

Rituximab (Mabthera®, anti-CD20) and trastuzumab (Herceptin®, anti-Her2) were purchased from Hoffman-La Roche (Basel, Switzerland). IvIg (Tegeline®, human immunoglobulins) was obtained from LFB (Courtaboeuf, France). The Chi-Tn mAb is a mouse/human chimeric IgG1 specific for the Tn-antigen (Oppezzo, 2000), which was produced and purified by RD Biotech (Besançon, France) following our technical indications.

### Flow cytometry

To analyze the Chi-Tn mAb binding to tumor cell plasma membrane, Jurkat ($10^6$), Shin-3, OvCar-3 or TA3Ha ($4 \times 10^5$) cells were incubated for 15 min on ice with the Chi-Tn mAb or a control antibody (IvIg for human cells or trastuzumab for murine cells) at 20 µg/ml in PBS containing 0.5% BSA and 0.01% azide (PBS-BSA-azide). After washing, cells were labeled using a secondary F(ab')2 goat anti-serum specific for the human Fc receptor for IgG (GaH-Fc) coupled to phycoerythrin (PE) (GaH-Fc-PE, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole)-negative living cells were acquired using a FACS Canto™ cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), and analyzed using the FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Copy number of Tn antigen was determined by quantitative flow cytometry using a murine anti-Tn mAb kindly provided by R. Lo-Man and C. Leclerc (Institut Pasteur, Paris, France) with the Qifikit (DAKO, Denmark) following the manufacturer's instructions.

To analyze Chi-Tn mAb internalization, Jurkat ($10^6$), Shin-3 or TA3Ha ($4 \times 10^5$) cells were incubated for 15 min on ice with the Chi-Tn mAb or with control antibodies at 20 µg/ml, washed, then transferred at 37°C in a 5% $CO_2$ atmosphere for the indicated periods of time. The incubation was stopped using cold PBS-BSA-azide, then the cells were labeled with GaH-Fc-PE. DAPI-negative living cells ($10^4$) were acquired by flow cytometry and analyzed as above.

**Biodistribution of the Chi-Tn mAb**

Nude (*nu/nu*) female mice (Charles River, France) (n=5) were injected subcutaneously (s.c.) into the flank on day 0 with 4 x $10^6$ Shin-3 ovarian tumor cells. Twelve days after tumor xenograft, when solid tumors were grown, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with the Chi-Tn mAb or the isotype control mAb (trastuzumab, Herceptin, Her) at 20 mg/kg in sterile PBS. Two days after (day 14), mice were euthanized. Solid tumor and organs (liver, spleen and lung) were removed, paraffin-embedded and sectioned. To detect Tn-positive cells, tissues sections were labeled with the Chi-Tn mAb followed by biotinylated GaH-Fc (GaH-Fc-Biot) and Streptavidin-Cy3 (Sa-Cy3). To detect *in vivo* the presence of the Chi-Tn mAb (or trastuzumab), tissues sections were labeled directly with GaH-Fc-Biot and Sa-Cy3. Nuclei were then stained with DAPI, and tissues were mounted to slides.

Images were acquired using a histology microscope Eclipse 90i (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Netherlands) equipped with a CDD camera (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific, Trenton, NJ), and a dry objective (x10 CFI Plan Apo, NA 0.45).

**Three-dimensional deconvolution microscopy**

To visualize the Chi-Tn mAb internalization into tumor cells by fluorescence microscopy, Jurkat ($10^6$), OvCar-3, Shin-3 or TA3Ha (4 x $10^5$) cells were incubated on ice with Chi-Tn at 40 µg/ml for 15 min, washed with cold medium, and then were incubated at 37°C for the indicated period of time. Internalization was stopped by adding cold PBS-BSA-azide. After washing with PBS containing 0.01% azide (PBS-azide), cells were allowed to adhere for 30 min at room temperature to poly-L-lysine coated glass coverslips, fixed and permeabilized using PBS containing 0.2% BSA and 0.05% saponin (PBS-BSA-saponin). Actin network was labeled using Phalloïdin coupled to Alexa Fluor 647 (Phal-A647, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The membrane-bound or internalized Chi-Tn mAb was revealed using GaH-Fc-Biot and Sa-Cy3. Cells were then stained with DAPI, and mounted to glass slides with Mowiol.

Early endosomes were detected using Transferrin-Alexa fluor 488 (Tf-A488, Molecular Probes), added to the cells at 10 µg/ml during the internalization period at 37°C. Recycling endosomes or late endosomes were revealed by adding Rab11 or LAMP-1 antibodies, respectively, (BD Biosciences) at 2.5 µg/ml on fixed cells, then with the corresponding Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody.

Images were acquired using a 3D microscope Eclipse 90i (Nikon) equipped with a CDD camera (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific), a piezzo flexure objective scanner (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany), and an oil-immersion objective (x100 CFI Plan Apo VC, NA

1.4). Deconvolutions were performed on stacks of images taken with 0.2 µm plane spacing, using the three-dimensional deconvolution module of MetaMorph® software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA) and the fast iterative constrained PSF-based algorithm.

**Antibody- drug conjugates**

The Chi-Tn mAb was coupled to saporin toxin (SAP) by Advanced Targeting Systems (ATS, San Diego, CA), with a molar ratio SAP / Chi-Tn = 2.7.

To prepare the conjugates with MMAF, 2 mg of mAb (Chi-Tn or Her) were thiolated for 1.5hrs at room temperature with 10 molar excess of Traut's Reagent added at ~14mM. The excess of Traut's Reagent was removed on PD-10 desalting columns (GE Healthcare) equilibrated in the conjugation buffer, the thiolated antibody should be protected from oxidation by adding EDTA to prevent heavy metal-catalyzed oxidization. The molarity of the SH functionality groups after thiolation was determined by the method of the Ellman reaction at A412. When compared with the molarity of the mAb itself, this value allowed calculation of the average reaction ratio of thiol/mAb. The reaction conditions employed yielded an average of 3 thiols groups per antibody. The thiolated antibody was then incubated with a 15-20 molar excess of maleimidocaproyl-MMAF (Concortis Biosystems, San Diego) at room temperature overnight. Then, modified antibodies were purified from the excess of the drug by PD-10 desalting columns in the conjugation buffer equilibrated with 10 fold-diluted 10 mM PBS (pH 8.0), 100 mM NaCl buffer. Fractions containing modified antibodies were pooled and concentrated using 10K centrifugation filters (Ultracel, Millipore). The protein concentration was estimated using the Nanodrop. The molarity of the drug functionality groups after the coupling reaction was determined by Maldi-Tof. The typical overall yield of this antibody modification procedure was ~ 2 to 3 drugs by antibody. Modified antibodies were stable for several weeks at 4°C.

**Cell viability assay**

Jurkat, TA3Ha, OvCar-3 or Shin-3 cells were plated in a 96-W flat bottom tissue culture plates at $10^4$ cells/well in triplicate. The mAb conjugated to drug or free drug were added at the indicated concentration, and plates were incubated for 3 days at 37°C. Cell viability was then assessed by adding the CellTiter Blue® Cell Viability reagent according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI) during the last 2h30 of culture for Jurkat cells or the last 4 h for the other tumor cells. The dye reduction was measured on a fluorescent plate reader. Results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells incubated in the same conditions.

## RESULTS

### Tn-binding of the Chi-Tn mAb to the tumor cell surface

The Chi-Tn mAb recognizes specifically the Tn antigen at the plasma membrane of ovarian cancer cells from patients' ascitis *in vivo*, and at the cell surface of human and mouse tumor cell lines *in vitro* (Oppezzo, 2000 / Hubert, 2011). As shown in Figure 1A, Jurkat cells (human T-ALL) displayed a strong Tn-specific binding of the Chi-Tn mAb to the cell surface detected by flow cytometry (mean fluorescence intensity, MFI: 49431). Moreover, human ovarian cancer cell lines, Shin-3 and OvCar-3, also bound the Chi-Tn mAb, although with a lower intensity than Jurkat cells. Tn surface expression was also detected by Chi-Tn in breast cancer cell lines, either from human origin, such MCF7 cells (Hubert, 2011) or from murine origin, such as TA3Ha cells (Fig. 1A).

The amount of surface-expressed Tn antigen was estimated by quantitative flow cytometry (Fig. 1B). Jurkat cells express the highest number of Tn molecules at the cell surface, approximately 5 x $10^5$ per cell, while Shin-3 or OvCar-3 cells express 6 x $10^4$ molecules per cell. The murine TA3Ha tumor cells express an intermediate level with 1.5 x $10^5$ mol./cell. This approximative quantification by flow cytometry was strongly correlated with the results obtained by Scatchard analysis using radiolabeled Chi-Tn (unpublished results from F. Davodeau). These results indicated that Tn is expressed and accessible at the plasma membrane of tumor cells, although at variable levels.

### *In vivo*, the Chi-Tn mAb specifically binds to tumor cells

The *in vivo* biodistribution and targeting of the Chi-Tn mAb was investigated in tumor bearing mice. Nude mice were injected s.c. with Shin-3 tumor cells. Mice bearing solid tumors were injected i.p. Chi-Tn mAb or control mAb (trastuzumab). Two days later, tumor and other organs were analyzed by immunohistochemistry (IHC, Fig. 2A). Shin-3 cells injected s.c. form solid Tn-positive tumors, that can be detected by IHC with the Chi-Tn mAb (Fig. 2B) and no tumor cells were detected in other organs such as liver, spleen or lungs (data not shown). Importantly, established solid tumor cells still expressed the Tn antigen. As shown in Figure 2C, the i.p.-injected Chi-Tn mAb was recovered in tumor sections while it was not detected in other organs (liver, spleen and lungs). Moreover, no mAb was detected in tumors from mice injected with the hIgG1 control mAb (data not shown). *In vivo*, the Chi-Tn mAb specifically targets subcutaneous tumors, whereas it has no detectable binding on normal tissues. The Chi-Tn mAb might be interesting to deliver radiation, drugs or toxins to tumor sites, without toxicity to normal tissue. To use the Chi-Tn

mAb as an antibody-drug conjugate (ADC), it has to be internalized effectively in its target cells to deliver the cytotoxic compound.

**Effective internalization of the Chi-Tn mAb**

We then analyzed the outcome of the Chi-Tn mAb after its binding to cell surface of tumor cells. When the tumor cells were transferred to 37°C after Chi-Tn mAb binding at 4°C, the quantity of Chi-Tn mAb present at the plasma membrane decreased rapidly in a time-dependent manner (Fig. 3A). Indeed, after 5 min at 37°C, only 20% of the Chi-Tn mAb initially bound was detected at the cell surface by flow cytometry. The percentage of the Chi-Tn mAb remaining at the plasma membrane after one hour at 37°C reached 15%, 4.4% and 10% on Jurkat, Shin-3 and TA3Ha cells respectively (Fig. 3A). These results showed that the Chi-Tn mAb disappeared from the plasma membrane at 37°C rapidly after Tn binding, suggesting that it could be either internalized into the cells or released into the extracellular medium.

To determine if the Chi-Tn mAb is internalized into tumor cells, the antibody was first bound to Jurkat, OvCar-3, Shin-3 or TA3Ha cell surface at 4°C, prior to transfer the cells for various times at 37°C. Analysis by deconvolution microscopy (Fig. 3B) showed that, at 4°C, the Chi-Tn mAb was localized at the plasma membrane of the cells. After 5 min incubation at 37°C, the Chi-Tn mAb was observed in intracellular structures distributed throughout the cytoplasm. Consistently with flow cytometry results, Chi-Tn internalization increased with time and was more noticeable in cells displaying initially high amounts of the Tn antigen at the plasma membrane (see Fig. 1). The Chi-Tn mAb-containing vesicles formed clusters close to the juxta-nuclear region after around 30 min at 37°C. After 15 min at 37°C, the Chi-Tn mAb was internalized in about 77%, 86%, 44% and 79% of Jurkat, OvCar-3, Shin-3, and TA3Ha cells, respectively (data not shown). We conclude that the Chi-Tn mAb binds to the plasma membrane of tumor cells, and is then rapidly internalized.

**Chi-Tn localizes to early and recycling endosomes**

After endocytosis, ligand-receptor complexes are internalized and sorted to early endosomes. Receptors are then either recycled back to the plasma membrane through recycling endosomes, or delivered to late endosomes and lysosomes for degradation (Sorkin, 2002 / Maxfield, 2004).

We investigated the nature of the compartment(s) targeted by the Chi-Tn mAb after internalization using markers of early endosomes, recycling rendosomes or late endosome/lysosomes. After internalization in Jurkat cells, Chi-Tn mAb accumulated in transferrin-

positive compartments, indicating its presence in early endosomes and/or recycling endosomes (Grant, 2009) (Fig. 4A). Chi-Tn was also present in Rab-11-positive recycling endosomes (Grant, 2009) (Fig. 4B), but with a lower proportion of co-localization than in the early endosomes. These co-localizations started as soon as 5 min and lasted for up to 4 h after transfer at 37°C. On the contrary, Chi-Tn could not be detected in late endosomal / lysosomal LAMP-1$^{+}$ compartments, even after 4 h of incubation at 37°C (Fig. 4C). We observed the same intracellular location of Chi-Tn in TA3Ha cells, with a co-localization in early endosomes and not detected in LAMP-1-positive compartments (data not shown). Therefore, internalized Chi-Tn, accumulates in early and recycling endosomes and is delivered inefficiently to late endosomes and lysosomes.

**The Chi-Tn mAb coupled to saporin inhibits tumor cell growth *in vitro***

Since Chi-Tn is effectively and rapidly internalized, we decided to evaluate if it could be used as an ADC. To do so, Chi-Tn was coupled to saporin (SAP), a ribosome-inactivating protein (RIP) that inhibits protein synthesis and prevents cell proliferation (Endo, 1987). Saporin-conjugated Chi-Tn (Chi-Tn/SAP, molar ratio: SAP / Chi-Tn = 2.7) induced a dose-dependent inhibition of the growth of the Tn-expressing tumor cell lines Jurkat and TA3Ha after a 3 days-treatment *in vitro* (Fig. 5B). The Chi-Tn/SAP $IC_{50}$ values were 7 x $10^{-11}$ M for Jurkat cells and 8 x $10^{-9}$ M for TA3Ha cells. As described previously (Hubert, 2011), the Chi-Tn mAb alone was ineffective at inhibiting Jurkat and TA3Ha *in vitro* cell proliferation. In addition, SAP alone inhibited Jurkat and TA3Ha cell growth at higher molar concentrations ($IC_{50}$: 3-4 x $10^{-8}$ M) than the SAP bound to Chi-Tn mAb (Fig. 5A). Therefore, tumor targeting using Chi-Tn/SAP conjugates would allow the use of lower doses of the cytotoxic SAP limiting adverse toxic effects. Neither Chi-Tn/SAP conjugates, nor did free saporin at high concentrations affected the human Tn-expressing ovarian cancer cell lines OvCar-3 and Shin-3, suggesting that these cells are resistant to the toxin (Fig. 5A). Chi-Tn/SAP conjugates also showed no cytotoxic effect on the Tn-negative EL-4 cell line (data not shown), while SAP alone inhibited the growth of these cells at concentrations similar to those inhibiting Jurkat and TA3Ha cell proliferation. Chi-Tn/SAP conjugate showed high toxicity for mice (data not shown), even at the low doses previously reported (Pastan, 2006). Collectively, these results demonstrate that Chi-Tn/SAP immunotoxins displays Tn-specific cell cytotoxicity *in vitro*, for concentrations of saporin lower than those required for cell growth inhibition using saporin alone.

**The Chi-Tn mAb coupled to auristatin F inhibits tumor cell growth *in vitro***

We prepared a second Chi-Tn ADC by coupling the mAb to the monomethyl auristatin F drug (MMAF), an antimitotic agent that inhibits cell division by blocking the polymerization of

tubulin (Doronina, 2006). MMAF is a monomethyl auristatin E (MMAE) derivative with a charged C-terminal phenylalanine residue that attenuates its cytotoxic activity compared to its uncharged counterpart MMAE because it reduces the passive redistribution of the drug throughout the plasma membrane when the drug has entered the cell (Doronina, 2006 / Oflazoglu, 2008 / Lee, 2009). MMAF was conjugated to Chi-Tn or to trastuzumab (herceptin, anti-Her2 mAb) control Ab through the protease-resistant maleimidocaproyl linker, which is stable in extracellular fluid, but is cleaved once the conjugate has entered a tumor cell, thus activating the anti-mitotic mechanism. The ADC contained an average of 2.6 to 3.5 MMAF molecules per antibody.

As shown in Figure 6A, free MMAF is cytotoxic to Tn-positive Jurkat and Her2 positive SKBR3 cells, with $IC_{50}$ values of $4.5 \times 10^2$ nM and $8.3 \times 10^1$ nM, respectively. On the contrary to the Chi-Tn mAb alone, which was ineffective at inhibiting the proliferation of the Tn-expressing tumor cells Jurkat, the Chi-Tn mAb conjugated to MMAF (Chi-Tn/MMAF, average molar ratio MMAF / Chi-Tn = 2.6) induced a dose-dependent cytotoxicity on these cells after a 3 days-treatment *in vitro* (Fig. 6B). We obtained the same cytotoxicity results when tumor cells were incubated for a long-term drug exposure assay (3 days) or pulsed only for 2 hours with the MMAF-conjugate prior to the 3-days culture (data not shown). Although the Chi-Tn/MMAF recognized Tn at the surface of all the Tn+ cell lines tested as effectively as the naked Chi-Tn mAb (data not shown), the conjugate Chi-Tn/MMAF did not exhibit cytotoxicity towards Shin-3 or OvCar-3 cells (data not shown). Importantly, the Chi-Tn/MMAF conjugate was specific for Tn expressing tumor cells (Fig. 6B). Moreover, in the same experiment, MMAF conjugated to a non-Tn binding mAb (trastuzumab Her/MMAF) has cytotoxic activity to Tn-positive Jurkat cells, indicating that cell killing was subsequent to binding to Tn. In parallel, Her/MMAF conjugate (molar ratio MMAF / Her = 3.5) was cytotoxic to Her2-expressing SKBR3 tumor cells (Fig. 6B). These results indicate that the Chi-Tn/MMAF ADC displays Tn-specific cell cytotoxicity *in vitro*, and is thus effective at targeting a cytotoxic drug to Tn antigen-expressing tumor cells.

## DISCUSSION

Ideal antibodies for delivering cytotoxic drugs specifically to tumors should target abundantly expressed tumor-specific surface receptors that are internalized efficiently resulting in effective drug delivery. The Tn antigen (GalNac-O-Ser/Threo) is expressed in a great variety of adenocarcinomas (Itzkowitz, 1989 / Pancino, 1990 / Beuzelin-Yvraut, 1995 / Croce, 2001 / Ju, 2002 / Ju, 2008 / Li, 2009 / Hubert, 2011) and in some haematologic malignancies (Inoue, 1994 / Aller, 1996 / Lawrie, 2006), but not in healthy tissue. It is, however, a rather complicated target as the antigen can be found on numerous different peptide sequences and can be presented to the host as clusters or as individual small epitopes. Here, we show that the Chi-Tn mAb is rapidly internalized selectively into Tn-positive tumor cells, and is localized mostly in early endosomes. We used an armed antibody approach, since the Chi-Tn mAb would be a good candidate to selectively deliver powerful cytotoxic agent to tumor cells. Indeed, we show in this study that Chi-Tn mAb inhibits Tn-positive tumor cell growth when coupled to the saporin or MMAF cytotoxic drugs, whereas Tn-negative cells remain unaffected.

The chimerization of the original murine anti-Tn 83D4 IgM Ab with human Fc generated the Chi-Tn mAb, which recognizes the Tn Ag on tumor cells with a 10-fold reduced affinity as compared to the original IgM (Kd 2.2 x $10^{-8}$ M; Osinaga, 2000). The moderate affinity might be correlated to the glycopeptidic nature of the Ag as compared to rituximab or trastuzumab, which are directed against protein (affinity of $10^{-9}$ to $10^{-10}$ M), since another IgG1 chimeric anti-Tn mAb was reported to have a low affinity ($10^{-7}$ M) (Ando, 2008). Even though intermediate affinities may be detrimental for binding and internalization, it was shown that low affinity mAbs may penetrate solid tumors more efficiently (Rudnick, 2011). After its binding to the surface-expressed Tn, the Chi-Tn mAb was internalized and during 4h detected mostly in the early endosomes and to a lesser extent in the recycling endosomes. Usually Abs bound to their ligand enter cells along the endocytic pathway, until they reach the acidic lysosomes where final degradation occurs (Lim, 2011). However, the clinically used therapeutic mAb trastuzumab directed against Her2 was similarly internalized in early / recycling endosomes where it remained for more than 3 hours and was then recycled to the plasma membrane in breast carcinoma cell lines, without reaching lysosomes (Austin, 2004). Other Abs were also described to localized in early and/or recycling vesicles (Iglesias-Bartolmé, 2006 / Perera, 2007) and still have antitumor effects. Drug targeting into early endosomes may therefore be an alternative to get effective antitumor responses by ADC therapy. Indeed, the anti-CD33-calicheamicin conjugate (gemtuzumab ozogamicin, Mylotarg®) containing a

pH-sensitive hydrazide linker was approved in 2000 for the treatment of acute myeloid leukemia (Chari, 2008), although it was recently withdrawn from the U.S. market.

Lysosomal compartments are also often the site of cleavage of ADC, especially when the linker contains a dipeptide such as the mc/Val-Cit/PAB used to bind MMAE or MMAF to Abs (Doronina, 2003 / Smith, 2008 / Asundi, 2011). Therefore, since the Chi-Tn mAb mainly localized to early endosomes, we chose to couple the Chi-Tn mAb using the protease-independent maleimidocaproyl linker, described previously to conjugate Abs to auristatin and to be as effective as the dipeptide-based linkers, with the advantage of decreased toxic adverse effect (Doronina, 2006 / Jackson, 2008). Even after overnight incubation at 37°C, we did not observe the Chi-Tn mAb in lysosomes using immunofluorescence. However, we cannot exclude that the mAb reaches lysosomes but is rapidly degraded. When Chi-Tn was injected into Shin-3 tumor bearing animals, the antibody was found to localize exclusively to the xenograft of the Shin-3 cell line, and was not present in healthy organs. Control mAb injected under the same conditions was not found within the tumor, suggesting that Chi-Tn indeed targets selectively a Tn-expressing tumor *in vivo*.

We first used Chi-Tn conjugated to the plant toxin Saporin, a ribosome-inactivating enzyme largely studied in the recent past (Beitz, 1992). Indeed, saporin is very stable, maintains its enzymatic activity after conjugation and resists to proteolytic degradation, thus producing very efficient conjugates for the killing of target cells (Polito 2011). The resulting ADC contains 2.7 saporin drugs per Chi-Tn antibody. We show that the proliferation of Tn-positive Jurkat and TA3Ha cells was strongly inhibited *in vitro* by the Chi-Tn/SAP immunotoxin. Free saporin was also cytotoxic on these cell lines, but at higher concentrations, while the unconjugated Chi-Tn mAb did not affect cell viability. Therefore, the Chi-Tn mAb can be used as an ADC to allow cytotoxicity against tumor cells using reduced amount of the toxin. Unfortunately we could not evaluate the Chi-Tn/SAP immunotoxin againt Shin-3 and Ovcar-3 human cell lines because the free saporin was not toxic for these cells and we did not elucidate the mechanism responsible for this resistance.

Chi-Tn was also conjugated to MMAF, which is less toxic as a free drug as compared to its parental MMAE molecule (Doronina, 2003, 2006 and our data not shown). Thus, in case of release of low amounts of the drug in extracellular environment before entering the target tumor cell, the possible adverse effects on healthy tissues are reduced. The optimal drug loading per antibody was already investigated and the best therapeutic index (ratio between an effective antitumor activity and the maximal tolerated dose) was obtained with 4 molecules per antibody (Hamblett, 2004). Our Chi-Tn/MMAF conjugate contains an average of 2.6 molecules per antibody, a molar ratio of that was previously shown to have antitumor activity with less adverse toxicity (Hamblett, 2004).

The quantity of Tn Ag expressed on the surface of tumor cells is variable among the different tumor cell lines analysed, with high levels on Jurkat leukemia cells, intermediate levels on TA3Ha murine breast carcinoma and lower amounts on Shin-3 and OvCar-3 ovarian tumor cells. In parallel, we demonstrated an inhibition of proliferation by the Chi-Tn conjugated to MMAF on Jurkat cells, but not on Shin-3 and OvCar-3, although these cells were sensitive to the free drug. This suggests that the level of antigen targeted by the ADC might be important to achieve an effective antitumor effect by the Chi-Tn-drug conjugate and this explanation is in agreement with previous studies comparing levels of antigen expressed on the target tumor cells and the cytotoxic effects of the specific conjugated mAb (Ryan, 2010 / Asundi, 2011 / Chen, 2007).

Therefore, we could document the internalization pathway of the Chi-Tn mAb and the *in vitro* antitumor effect of a conjugate based on Chi-Tn linked to a cytotoxic drug to deliver selectively the drug to tumor cells. Our results establish the proof of concept that an anti-Tn mAb can be used as an antibody-drug conjugate.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the Cytometry Platform, the Nikon Imaging Center and the Animal facilities of the Institut Curie. We acknowledge the Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 507, Institut Curie, Paris. We also specifically thank Virginie Premel for her help in immunohistochemistry.

This work was supported by fundings from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); the Institut Curie; the Institut National du Cancer (INCa).

**REFERENCES**

- Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1147-57.
- Ando H, Matsushita T, Wakitani M, Sato T, Kodama-Nishida S, Shibata K, et al. Mouse-human chimeric anti-Tn IgG1 induced anti-tumor activity against Jurkat cells in vitro and in vivo. Biol Pharm Bull 2008;31:1739-44.
- Aller CT, Kucuk O, Springer GF, Gilman-Sachs A. Flow cytometric analysis of T and Tn epitopes on chronic lymphocytic leukemia cells. Am J Hematol. 1996 May;52(1):29-38.
- Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, Luis E, Tien J, Firestein R, Polakis P. An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma. Clin Cancer Res. 2011 Mar 1;17(5):965-75.
- Avichezer D, Springer GF, Schechter B, Arnon R. Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model. Int J Cancer 1997;72:119-27.
- Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Aug 10;59(8):748-58.
- Beitz JG, Davol P, Clark JW, Kato J, Medina M, Frackelton AR Jr, Lappi DA, Baird A, Calabresi P. Antitumor activity of basic fibroblast growth factor-saporin mitotoxin in vitro and in vivo. Cancer Res. 1992 Jan 1;52(1):227-30.
- Beuzelin-Yvraut M, Bourguignat A, Phillips E, Roseto A, Osinaga E. Immunocytological analysis of the Tn associated antigen 83D4 in serous effusions from patients with cancer: comparison with Tn soluble glycoprotein. J Clin Pathol 1995;48:433-7.
- Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Acc Chem Res. 2008 Jan;41(1):98-107.
- Charpin C, Pancino G, Osinaga E, Bonnier P, Lavaut MN, Allasia C, et al. Monoclonal antibody 83D4 immunoreactivity in human tissues: cellular distribution and microcytophotometric analysis of immunoprecipitates on tissue sections. Anticancer Res 1992;12:209-23.
- Chen Y, Clark S, Wong T, Chen Y, Chen Y, Dennis MS, Luis E, Zhong F, Bheddah S, Koeppen H, Gogineni A, Ross S, Polakis P, Mallet W. Armed antibodies targeting the mucin repeats of the ovarian cancer antigen, MUC16, are highly efficacious in animal tumor models. Cancer Res. 2007 May 15;67(10):4924-32.

- Croce MV, Rabassa ME, Price MR, Segal-Eiras A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. Pathol Oncol Res 2001;7:284-91.
- Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, Uggeri F, Paoletti S, Colombatti A. A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. Glycobiology. 2009 Oct;19(10):1056-67. Epub 2009 Jun 15.
- Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cerveny CG, Chace DF, DeBlanc RL, Gearing RP, Bovee TD, Siegall CB, Francisco JA, Wahl AF, Meyer DL, Senter PD. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nat Biotechnol. 2003 Jul;21(7):778-84.
- Doronina SO, Mendelsohn BA, Bovee TD, Cerveny CG, Alley SC, Meyer DL, Oflazoglu E, Toki BE, Sanderson RJ, Zabinski RF, Wahl AF, Senter PD. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006,17:114-24.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. J Biol Chem. 1987, 262:5908-12.
- Erickson HK, Park PU, Widdison WC, Kovtun YV, Garrett LM, Hoffman K, Lutz RJ, Goldmacher VS, Blättler WA. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):4426-33.
- Falguières T, Luyet PP, Gruenberg J. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. Exp Cell Res. 2009 May 15;315(9):1567-73.
- Flygare JA, Pillow TH, Aristoff P. Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer. Chem Biol Drug Des. 2013 Jan;81(1):113-21.
- Govindan SV, Goldenberg DM. New antibody conjugates in cancer therapy. ScientificWorldJournal. 2010 Oct 12;10:2070-89.
- Govindan SV, Goldenberg DM. Designing immunoconjugates for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther. 2012 Jul;12(7):873-90.
- Grant BD, Donaldson JG. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009; 10:597-608.

- Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MM, Lenox J, Cerveny CG, Kissler KM, Bernhardt SX, Kopcha AK, Zabinski RF, Meyer DL, Francisco JA. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. Clin Cancer Res. 2004 Oct 15;10(20):7063-70.
- Hrubý M, Konák C, Ulbrich K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. J Control Release. 2005 Mar 2;103(1):137-48.
- Hubert P, Heitzmann A, Viel S, Nicolas A, Sastre-Garau X, Oppezzo P, Pritsch O, Osinaga E, Amigorena S. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. Cancer Res. 2011 Aug 1;71(15):5134-43.
- Iglesias-Bartolomé R, Crespo PM, Gomez GA, Daniotti JL. The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. Inhibitory effect of brefeldin A and monensin. FEBS J. 2006 Apr;273(8):1744-58.
- Inoue M, Nakada H, Tanaka N, Yamashina I. Tn antigen is expressed on leukosialin from T-lymphoid cells. Cancer Res. 1994 Jan 1;54(1):85-8.
- Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, et al. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. Cancer Res 1989;49:197-204.
- Jackson D, Gooya J, Mao S, Kinneer K, Xu L, Camara M, Fazenbaker C, Fleming R, Swamynathan S, Meyer D, Senter PD, Gao C, Wu H, Kinch M, Coats S, Kiener PA, Tice DA. A human antibody-drug conjugate targeting EphA2 inhibits tumor growth in vivo. Cancer Res. 2008 Nov 15;68(22):9367-74.
- Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:16613-8.
- Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, et al. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. Cancer Res 2008;68:1636-46.
- Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. Angew Chem Int Ed Engl. 2011 Feb 18;50(8):1770-91.
- Lawrie CH, Marafioti T, Hatton CS, Dirnhofer S, Roncador G, Went P, Tzankov A, Pileri SA, Pulford K, Banham AH. Cancer-associated carbohydrate identification in Hodgkin's lymphoma by carbohydrate array profiling. Int J Cancer. 2006 Jun 15;118(12):3161-6.
- Lee JW, Han HD, Shahzad MM, Kim SW, Mangala LS, Nick AM, Lu C, Langley RR, Schmandt R, Kim HS, Mao S, Gooya J, Fazenbaker C, Jackson D, Tice DA, Landen CN, Coleman RL, Sood AK. EphA2 immunoconjugate as molecularly targeted chemotherapy for ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst. 2009 Sep 2;101(17):1193-205.
- Li Q, Anver MR, Butcher DO, Gildersleeve JC. Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines. Mol Cancer Ther 2009;8:971-9.

- Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HT, Beers SA, French RR, Cox KL, Davies AJ, Potter KN, Mockridge CI, Oscier DG, Johnson PW, Cragg MS, Glennie MJ. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. Blood. 2011 Sep 1;118(9):2530-40.
- Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):121-32.
- Nakada H, Inoue M, Numata Y, Tanaka N, Funakoshi I, Fukui S, et al. Epitopic structure of Tn glycophorin A for an anti-Tn antibody (MLS 128). Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:2495-9.
- Oflazoglu E, Stone IJ, Gordon K, Wood CG, Repasky EA, Grewal IS, Law CL, Gerber HP. Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker. Clin Cancer Res. 2008 Oct 1;14(19):6171-80.
- Oppezzo P, Osinaga E, Tello D et al. Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen. Hybridoma 2000; 229-39
- Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, et al. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectrospcopy. FEBS Letters 2000;469:24-8.
- Pancino GF, Osinaga E, Vorauher W, Kakouche A, Mistro D, Charpin C, Roseto A. Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. Hybridoma. 1990 Aug;9(4):389-95.
- Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7):559-65.
- Perera RM, Zoncu R, Johns TG, Pypaert M, Lee FT, Mellman I, Old LJ, Toomre DK, Scott AM. Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody. Neoplasia. 2007 Dec;9(12):1099-110.
- Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, Bolognesi A. Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. Toxins (Basel). 2011 Jun;3(6):697-720.
- Rudnick SI, Lou J, Shaller CC, et al. Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. Cancer Res. 2011 Mar 15;71(6):2250-9.
- Ryan MC, Kostner H, Gordon KA, Duniho S, Sutherland MK, Yu C, Kim KM, Nesterova A, Anderson M, McEarchern JA, Law CL, Smith LM. Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. Br J Cancer. 2010 Aug 24;103(5):676-84.
- Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, Meredith SC, et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. Science 2006;314:304-8.

- Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, Zabinski RF, Sutherland MK, Gerber HP, Van Orden KL, Moore PA, Ruben SM, Carter PJ. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. Br J Cancer. 2008 Jul 8;99(1):100-9.
- Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Aug;3(8):600-14.
- Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. Science 1984; 224:1198-1206.
- Teicher BA. Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets. 2009 Dec;9(8):982-1004.
- Ulbrich K, Subr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Apr 23;56(7):1023-50.
- Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. Oncoimmunology. 2013 Jan 1;2(1):e22789.
- Van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. Trends Cell Biol. 2006 Oct;16(10):514-21.
- Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1137-46.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Tn-specific binding of the Chi-Tn mAb to the tumor cell surface.**

**A)** Jurkat, Shin-3, OvCar-3 or TA3Ha cells were labeled with the Chi-Tn mAb or a control antibody (IvIg for human cells or trastuzumab for murine cells) at 20 µg/ml, then with a GaH-Fc-PE secondary antibody. DAPI-negative living cells were acquired by flow cytometry and the PE mean fluorescence intensity (M.F.I.) was determined and is indicated for each sample. Numbers in the quadrants: % of cells. **B)** The number of Tn motifs expressed at the cell surface of different tumor cell lines was estimated by quantitative flow cytometry using a murine anti-Tn mAb.

**Figure 2: *In vivo* biodistribution of the Chi-Tn mAb.**

**A)** Nude mice were grafted s.c. with 4 x $10^6$ Shin-3 tumor cells, and were injected i.p. on day 12 with the Chi-Tn mAb or the control mAb at 20 mg/kg. On day 14, solid tumor and organs were removed and sectioned for immunofluorescence (IF) studies. **B)** To detect Tn-positive cells, tissues sections were labeled with the Chi-Tn mAb, and with GaH-Fc-Biot and Sa-Cy3. **C) and D)** To detect the presence of the Chi-Tn mAb (or control mAb, red), tumor **(C)** or tissues **(D)** sections were labeled directly with GaH-Fc-Biot and Sa-Cy3. Nuclei were labeled using DAPI (blue), and images were acquired by microscopy.

**Figure 3: The Chi-Tn mAb is internalized into cancer cells.**

**A)** Jurkat, Shin-3 or TA3Ha cells were incubated for 15 min on ice with the Chi-Tn mAb or with a control antibody (IvIg for human cells or trastuzumab for murine cells) at 20 µg/ml, washed, then transferred to 37°C for the indicated times. Cells were then labeled with GaH-Fc-PE, and the Chi-Tn M.F.I. was determined by flow cytometry in the DAPI-negative living cells gate. For each sample, the Chi-Tn M.F.I. is expressed as a percentage of the Chi-Tn M.F.I. obtained for cells not transferred to 37°C (control cells). **B)** Jurkat, OvCar-3, Shin-3 or TA3Ha cells were incubated on ice with the Chi-Tn mAb for 15 min, washed and transferred to 37°C for the indicated period of time. Cells were then fixed to glass coverslips and labeled. Yellow: Actin network; pink: membrane-bound or internalized Chi-Tn mAb; blue: DAPI. Arrows indicate examples of internalized Chi-Tn mAb.

**Figure 4: Analysis of the Chi-Tn mAb targeting to endosomal compartments**

Jurkat cells were labeled with the Chi-Tn mAb, transferred to 37°C for the indicated times, then actin (yellow) and Chi-Tn (pink) were detected in fixed cells. Early endosomes were detected using

Tf-A488 (green, **A**), recycling endosomes with Rab11 (green, **B**), and late endosomes with anti-LAMP-1 mAb (green, **C**). Blue: DAPI. Images were acquired by deconvolution 3D-microscopy. Examples of co-localizations (in white) are indicated by arrows.

**Figure 5: *In vitro* cytotoxicity of Chi-Tn/SAP conjugate on cancer cells**

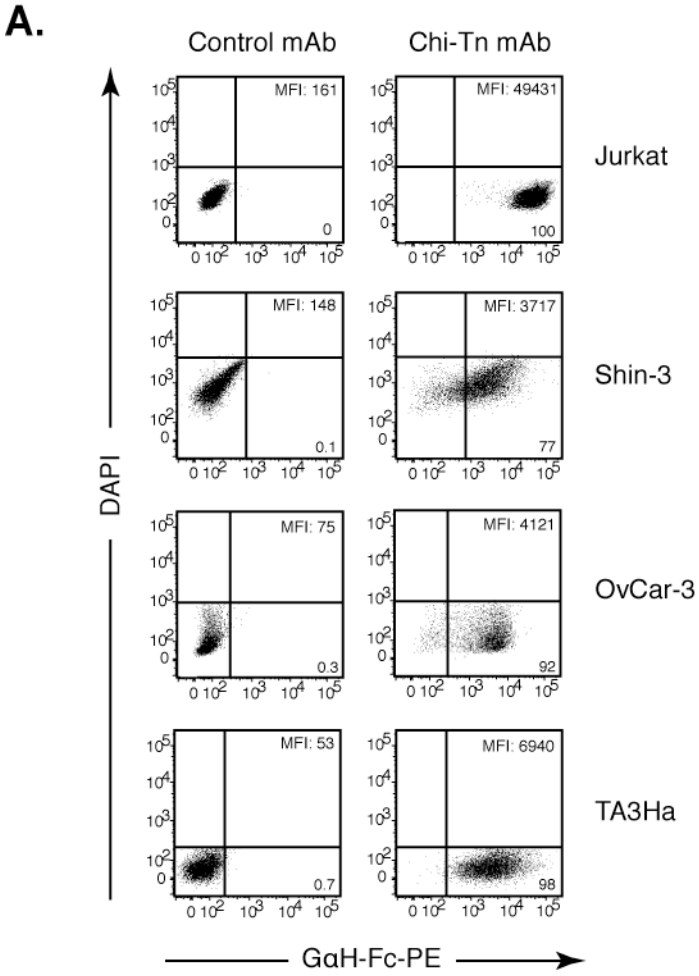
Jurkat or TA3Ha cells were cultured **A)** with saporin alone (SAP) or **B)** with the Chi-Tn/SAP conjugate, or with the Chi-Tn mAb alone, at the indicated concentrations. Cell viability was then assessed after 3 days at 37°C by addition of Cell Titer Blue reagent during the last few hours of incubation. Results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells.

**Figure 6: *In vitro* cytotoxicity of Chi-Tn/MMAF conjugate on cancer cells.**

Jurkat or SKBR3 cells were cultured **A)** with MMAF alone at the indicated concentration, **B)** with the Chi-Tn/MMAF or Her/MMAF conjugate, Chi-Tn or Her mAb alone, at the indicated concentration. Cell viability was then assessed after 3 days at 37°C. Results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells. MMAF: monomethyl auristatin F; Her: Herceptin mAb; ADC: Antibody-drug conjugate.

**FIGURES**

**Figure 1**




**B.**

| Tumor cell line | Tumor origin | Tn amount[a] (x10$^3$/cell) |
|---|---|---|
| Jurkat | Human T-ALL | 500 |
| Shin-3 | Human ovarian | 60 |
| OvCar-3 | Human ovarian | 60 |
| TA3Ha | Murine breast | 150 |

[a] determined by quantitative flow cytometry

**Figure 2**

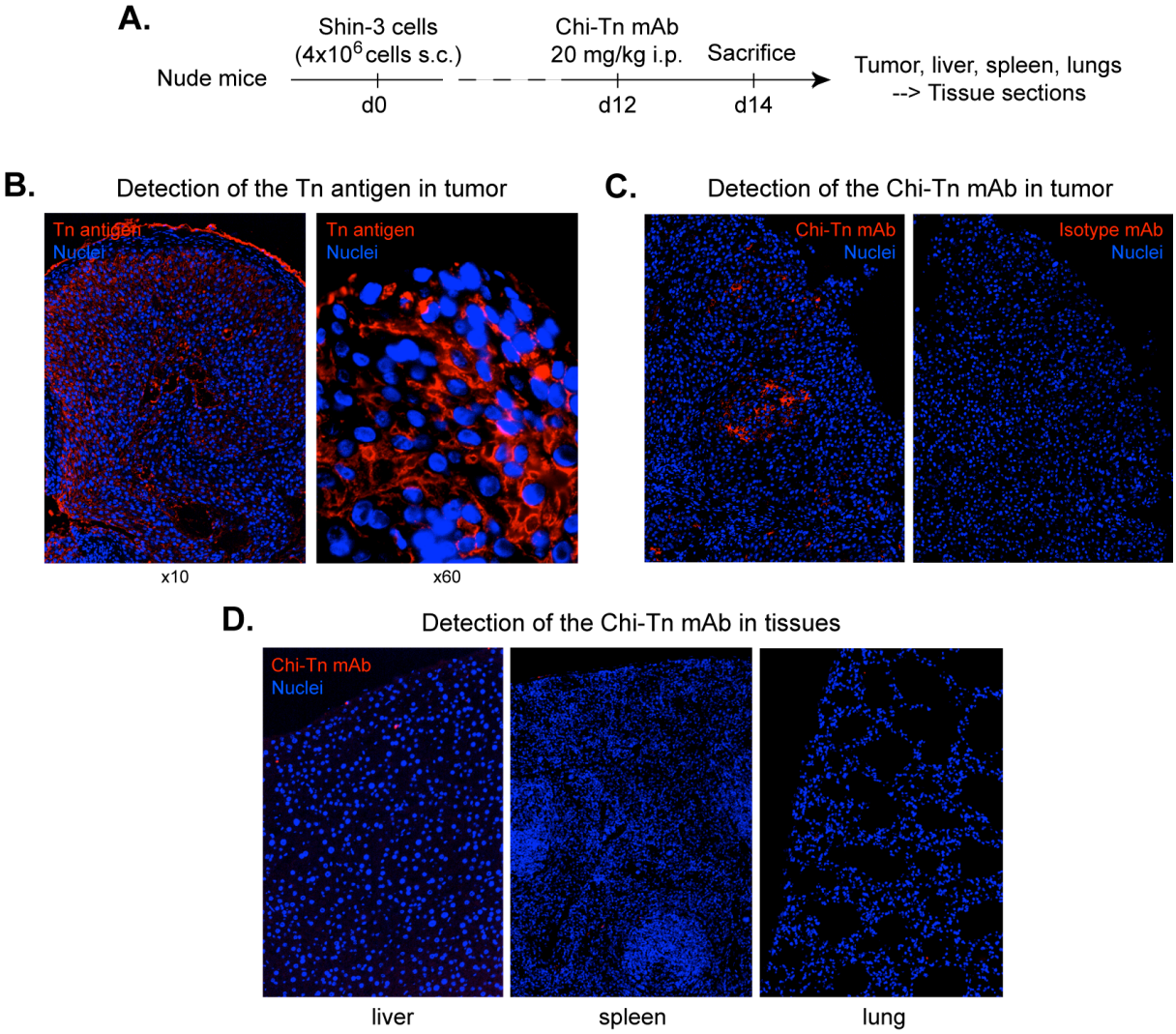

A.
Shin-3 cells
(4x10^6 cells s.c.)
Chi-Tn mAb
20 mg/kg i.p.
Sacrifice
Nude mice
d0
d12
d14
Tumor, liver, spleen, lungs
--> Tissue sections
B.
Detection of the Tn antigen in tumor
Tn antigen
Nuclei
Tn antigen
Nuclei
x10
x60
C.
Detection of the Chi-Tn mAb in tumor
Chi-Tn mAb
Nuclei
Isotype mAb
Nuclei
D.
Detection of the Chi-Tn mAb in tissues
Chi-Tn mAb
Nuclei
liver
spleen
lung

**Figure 3**

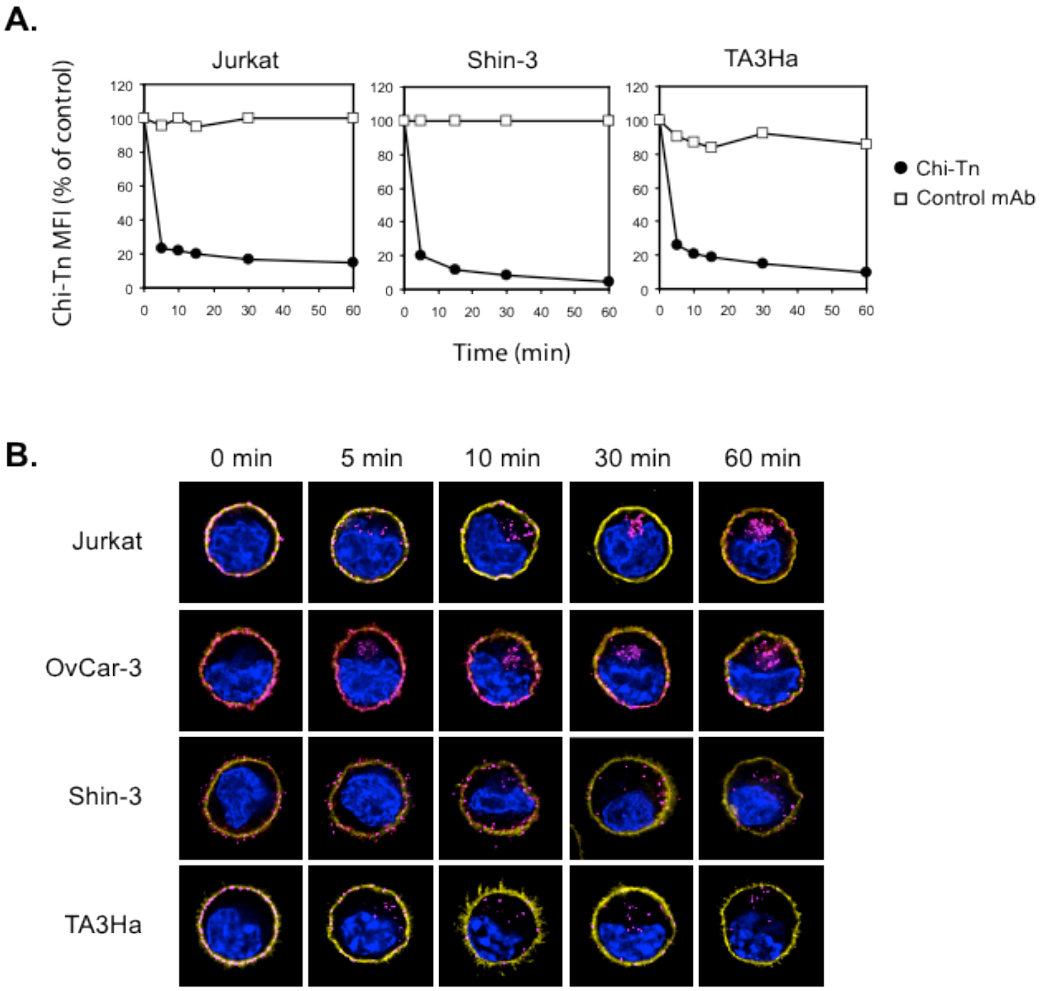

A.
Jurkat
Shin-3
TA3Ha
Chi-Tn MFI (% of control)
Time (min)
Chi-Tn
Control mAb
B.
0 min
5 min
10 min
30 min
60 min
Jurkat
OvCar-3
Shin-3
TA3Ha

**Figure 4**

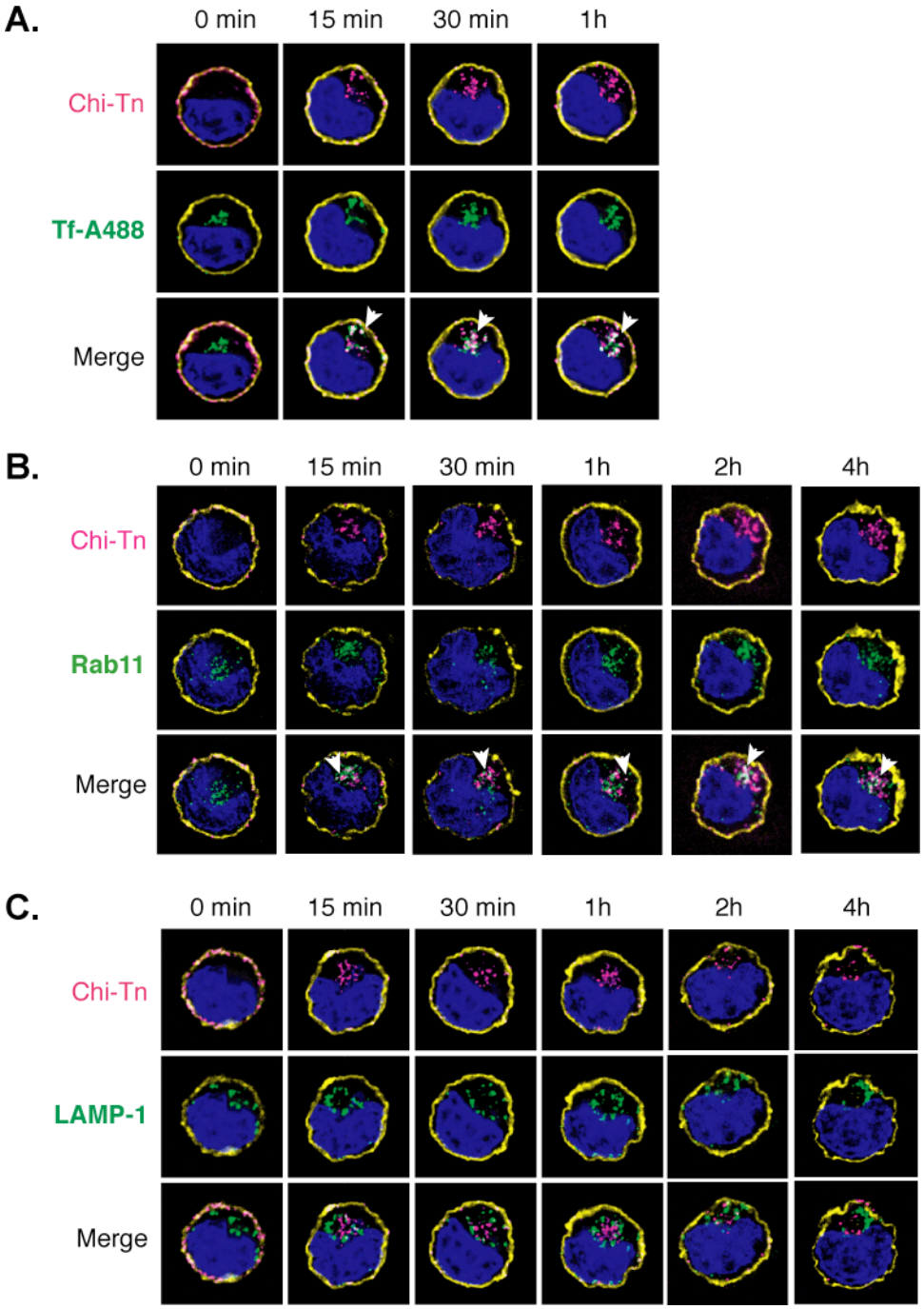

A.
0 min
15 min
30 min
1h
Chi-Tn
Tf-A488
Merge
B.
0 min
15 min
30 min
1h
2h
4h
Chi-Tn
Rab11
Merge
C.
0 min
15 min
30 min
1h
2h
4h
Chi-Tn
LAMP-1
Merge

**Figure 5**

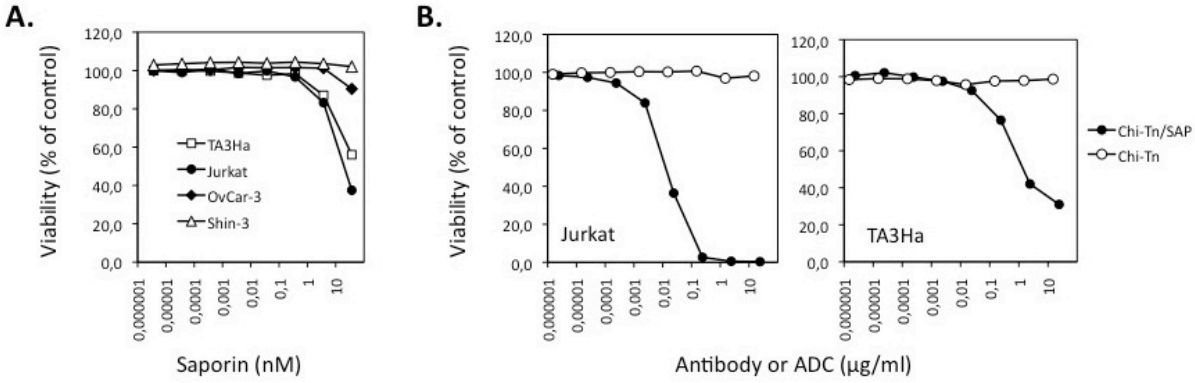
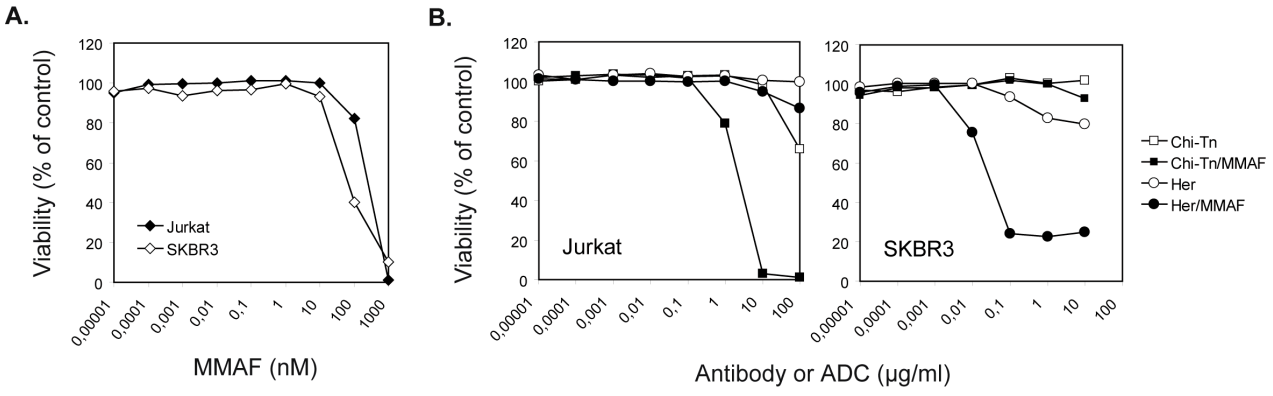

A.
B.
Viability (% of control)
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
TA3Ha
Jurkat
OvCar-3
Shin-3
0,000001
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Saporin (nM)
Jurkat
TA3Ha
Chi-Tn/SAP
Chi-Tn
Antibody or ADC (µg/ml)

**Figure 6**


A.
Viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
Jurkat
SKBR3
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
MMAF (nM)
B.
Viability (% of control)
Jurkat
SKBR3
Antibody or ADC (µg/ml)
Chi-Tn
Chi-Tn/MMAF
Her
Her/MMAF

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## Contexte

La transformation des cellules normales de l'organisme en un phénotype malin est souvent accompagnée de changements dans leur antigénicité. L'antigène glycopeptidique Tn est formé par un résidu N-acétyl-Galactosamine (GalNac) lié par *O*-glycosylation aux acides aminés Sérine (Ser) ou Thréonine (Thr) présents dans les protéines membranaires de type mucine (Springer G, 1984, 1995; Guillot J; Napoletano C, 2007). Il est exprimé spécifiquement à la surface des cellules tumorales dans 90% des carcinomes épithéliaux humains du fait d'une dérégulation des processus de glycosylation (Springer G, 1984, 1995; Guillot J, 2004), tandis qu'il n'est pas détectable dans les cellules normales. Il représente donc une cible potentielle très intéressante pour l'immunothérapie passive par anticorps.

Les AcM spécifiques d'antigènes exprimés à la membrane des cellules tumorales ont une efficacité prouvée dans le traitement de certains cancers. Ces AcM thérapeutiques sont particulièrement intéressants pour le traitement des cancers du fait de leur forte spécificité pour les cellules tumorales et de leur faible toxicité pour les cellules normales, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles. Ils peuvent être utilisés « nus » afin d'inhiber directement la croissance tumorale par un mécanisme d'apoptose et/ou indirectement, en stimulant le système immunitaire (ADCC...). Ces AcM thérapeutiques peuvent également être utilisés en tant qu'immunoconjugués, afin de délivrer spécifiquement une molécule cytotoxique dans les cellules tumorales, sans affecter les tissus sains.

L'AcM Chi-Tn est un anticorps chimérique homme/souris de type IgG1 capable de se fixer de façon spécifique à l'antigène tumoral Tn, alors qu'il ne se fixe pas sur les cellules normales. Cet AcM pourrait donc être envisagé comme agent thérapeutique dans le traitement des cancers épithéliaux par immunothérapie passive.

Les objectifs de ma thèse sont de décrire le(s) mécanisme(s) d'action de l'AcM Chi-Tn, et d'évaluer son efficacité en immunothérapie passive par anticorps, ainsi que la potentialité de son utilisation chez l'homme, en tant qu'anticorps « nu » ou en tant qu'anticorps couplé.

# I. ACTIVITE ANTITUMORALE DE L'ACM CHI-TN NU ET MECANISMES D'ACTION

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'AcM Chi-Tn non couplé en vue d'analyser son mécanisme d'action et d'évaluer son efficacité thérapeutique *in vivo* dans un modèle syngénique de tumeur mammaire murine TA3Ha.

## A. Caractérisation de l'antigène Tn

Il a été montré que les mucines, étaient des glycoprotéines transmembranaires dont la partie extracellulaire, riche en acides aminés Ser et Thr, permettait la fixation de nombreux *O*-glycanes tels que l'antigène tumoral Tn sur les cellules épithéliales (Napoletano C, 2007). En particulier les mucines MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 ont été décrites dans des cas de carcinome mammaire (Matsukita S, 2003). Par ailleurs, des études ont montré que la protéine CD43 présente à la surface des cellules lymphocytaires Jurkat était porteuse de l'antigène tumoral Tn (Piller F, 1988). Ainsi, l'antigène Tn pourrait être exprimé également par d'autres glycoprotéines présentant des *O*-glycosylations, autres que les mucines et la protéine CD43. Il serait donc utile d'identifier plus précisément la nature et la diversité de ces protéines portant l'antigène Tn et de déterminer si celles-ci sont identiques dans différentes lignées d'un même type histologique. Cela permettrait ensuite d'analyser précisément les évènements moléculaires déclenchés lors de la fixation de l'AcM Chi-Tn sur les cellules tumorales afin d'analyser le mécanisme d'action de ce dernier.
Les résultats de Mazal D. *et al.* ont montré que la combinaison des acides aminés Ser et Thr, sur laquelle est greffée le motif GalNac, était impliquée dans la fixation et la spécificité des anticorps anti-Tn pour un antigène Tn synthétique (Mazal D, 2013). Il serait donc intéressant de déterminer le motif précis reconnu par l'AcM Chi-Tn dans les lignées cellulaires utilisées lors de nos expériences afin de mieux décrire la spécificité de l'AcM.

## B. Mécanisme d'action de l'AcM Chi-Tn *in vitro*

La plupart des AcM thérapeutiques spécifiques de tumeurs utilisés cliniquement (trastuzumab, cetuximab, rituximab) ont un effet apoptotique ou antiprolifératif direct sur les lignées cellulaires tumorales *in vitro,* par exemple en perturbant la signalisation de récepteurs membranaires. L'AcM Chi-Tn seul possède un effet apoptotique direct sur les cellules tumorales lymphoïdes humaines Jurkat *in vitro,* mais uniquement lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées, ou après cross-

linking avec un anticorps secondaire (Article 1, Fig. 2). En revanche, il ne possède pas d'effet toxique direct sur les lignées cellulaires épithéliales Tn-positives, contrairement au trastuzumab par exemple, capable d'inhiber la croissance des cellules Her2$^{+}$ SKBR3 (Carter P, 1992). En effet, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn seul n'affectait pas la viabilité et la prolifération des cellules tumorales murines TA3Ha ou des cellules humaines Shin-3 et MCF-7 (Article 1, Fig. 2 et S4).
Cependant, en présence de macrophages RAW activés, l'AcM Chi-Tn est capable d'induire *in vitro* la lyse de ces cellules Tn-positives par un mécanisme de type ADCC (Article 1, Fig. 4A). Ce mécanisme d'ADCC est utilisé par de nombreux AcM thérapeutiques, et constitue notamment un des mécanismes d'action principal du rituximab (Probst A, 2006), mais aussi du trastuzumab (Musolino A, 2008), du cetuximab (Vincenzi B, 2008) ou encore de l'alemtuzumab. Ces anticorps thérapeutiques sont en effet capables de lyser des cellules cibles cancéreuses en présence de cellules effectrices cytotoxiques exprimant un récepteur RFcγ activateur.

## C. Effet thérapeutique de l'AcM Chi-Tn *in vivo*

*In vivo*, chez des souris porteuses de cellules de carcinome mammaire TA3Ha greffées dans la cavité péritonéale, l'AcM Chi-Tn, associé à la cyclophosphamide (CTX), induit le rejet de cette tumeur dans plus de 80% des souris (Article 1, Fig. 3A). De plus, les souris ayant survécu à la première injection de cellules TA3Ha semblent résistantes à une seconde greffe (Article 1, Fig. 3C). L'inhibition de la croissance tumorale est abolie chez les souris déficientes pour la chaine γ associée aux récepteurs RFcγ activateurs (Articel 1, Fig. 4B), suggérant *in vivo* un mécanisme d'ADCC impliquant des cellules effectrices portant les récepteurs FcγR activateurs, tels que les macrophages et les cellules NK (Clynes RA, 2000).

### *1) Synapses-ADCC entre les cellules tumorales et les effecteurs*

Par une approche originale de microscopie 3D à déconvolution, nous avons également étudié le microenvironnement tumoral du péritoine des souris greffées. Nous avons montré que les cellules tumorales TA3Ha-GFP forment *in vivo* des conjugués stables avec des cellules immunitaires effectrices myéloïdes et lymphoïdes exprimant des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (Article 1, Fig. 5B). Nous avons pu détecter des cellules exprimant des récepteurs RFcγ activateurs, telles que des macrophages (F4/80$^{+}$) et des neutrophiles (Ly6G$^{+}$), mais aussi des cellules exprimant des récepteurs RFcγIIB inhibiteurs, telles que des lymphocytes B (CD19$^{+}$) (Article 1, Fig. 5C). La projection orthogonale des images de microscopie révèle que la zone de contact, riche en actine, entre ces cellules effectrices et les cellules tumorales est organisée

en clusters d'activation supra-moléculaire (SMACs), que nous appelons « synapse-ADCC » (Article 1, Fig. 5C). Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'interactions entre les cellules tumorales et les lymphocytes T présents dans la cavité péritonéale des souris. Curieusement, au cours de ces expériences *in vivo*, nous n'avons jamais détecté de cellules NK en suspension dans le péritoine des souris. De ce fait, nous n'avons pas observé de contacts entre les cellules tumorales TA3Ha-GFP et les cellules NK.

Dans ce travail de thèse, il aurait été intéressant de mieux définir en termes phénotypiques les différents effecteurs mis en jeu dans ces conjugués en utilisant d'autres marqueurs cellulaires fluorescents. Notamment dans des expériences similaires *in vivo* (résultats non présentés), nous avons regardé si les lymphocytes B mis en jeu dans les conjugués pouvaient être des lymphocytes B régulateurs producteurs d'interleukine IL-10 (ou cellules B10), connus pour jouer un rôle dans la régulation de l'inflammation et l'autoimmunité par la production d'IL-10. En effet, l'équipe de Tedder T. *et al* a montré que les cellules B10 endogènes ($CD1d^{hi}CD5^{+}$) sont de puissants régulateurs négatifs de l'immunité innée, capables d'inhiber l'effet thérapeutique de l'AcM anti-CD20 en immunothérapie des lymphomes B non-Hodgkiniens (Horikawa M, 2011). Cependant, les marquages des cellules $CD19^{+}$ et $CD5^{+}$ dans la cavité péritonéale de souris (porteuses de tumeurs ou non) ne nous ont pas permis de détecter des cellules doublement marquées $CD19^{+}CD5^{+}$ correspondant aux B10, probablement parce qu'elles ne sont pas présentes en assez grand nombre par rapport aux cellules $CD19^{+}CD5^{-}$ (lymphocytes B "classiques") ou aux $CD19^{-}CD5^{+}$ (lymphocytes T).

Le « cross-linking » de l'AcM Chi-Tn avec le FcγR, entraînant la formation des synapses-ADCC, ne semble pas suffisant à lui seul pour assurer l'élimination des cellules tumorales TA3Ha *in vivo.* En effet, ces synapses sont toujours observées (mais en moins grand nombre) dans des conditions expérimentales pour lesquelles aucun effet antitumoral n'a été observé, comme par exemple dans le cas de souris déficientes pour la chaîne γ des RFc traitées CTX+Chi-Tn, ou dans le cas de souris WT traitées avec l'AcM Chi-Tn en l'absence de CTX (Article 1, Fig. 5B).

Ces résultats suggèrent que l'élimination des cellules tumorales par un mécanisme d'ADCC nécessite certes la formation de synapses-ADCC entre les cellules tumorales et les cellules effectrices, mais nécessite également l'activation de ces cellules effectrices via leurs récepteurs RFcγ activateurs.

## 2) Les effecteurs impliqués dans l'inhibition de la croissance tumorale

Afin de confirmer si les cellules du système immunitaire observées dans les synapses-ADCC avec les cellules tumorales reflètent vraiment les effecteurs responsables *in vivo* de l'effet antitumoral de l'AcM Chi-Tn, nous avons analysé la(les) population(s) cellulaire(s) effectrice(s) impliquée(s) dans le rejet de la tumeur TA3Ha par des expériences de survie *in vivo*, en utilisant des souris déficientes pour différentes populations cellulaires et greffées avec la tumeur mammaire TA3Ha.

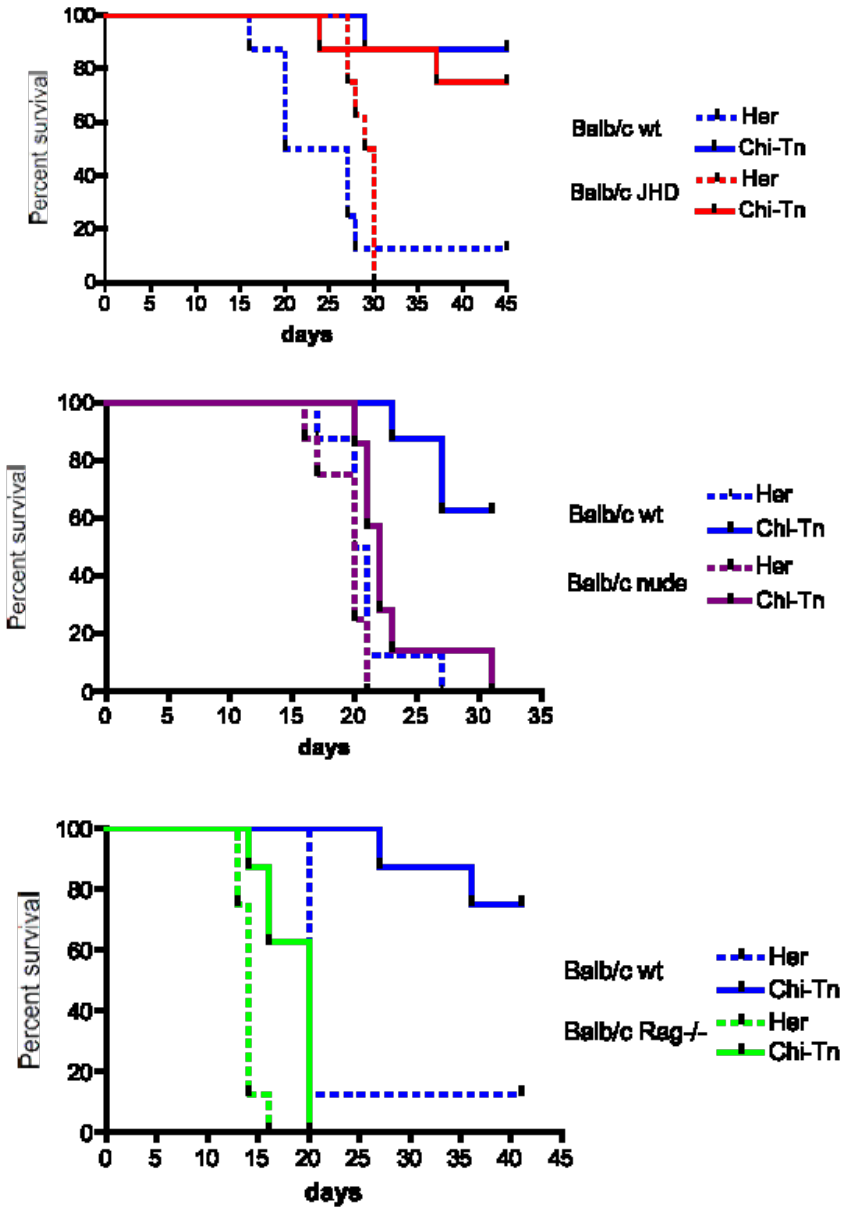



**Figure supplémentaire: Analyse des effecteurs impliqués dans l'activité antitumorale de Chi-Tn *in vivo*.**
Les souris de fond génétique BALB/c ont été greffées i.p. avec les cellules tumorales TA3Ha (jour 0), traitées i.p. avec la CTX (50 mg/kg, jour 1), puis traitées i.p. à partir du jour 2 avec l'AcM Chi-Tn à 20 mg/kg ou avec l'AcM contrôle Herceptin (Her), 2 fois par semaine, avec un total de 6 injections.
**A.** Souris BALB/c JHD (fournies gracieusement par David Grey, Edimburg). **B.** Souris BALB/c nude (Charles River France). **C.** Souris BALB/c $RAG^{-/-}$ (fournies gracieusement par James di Santo, Insitut Pasteur). Les mêmes résultats sont obtenus dans les souris BALB/c $RAG^{-/-}$ ou $RAG^{-/-}\gamma c^{-/-}$.

Nos résultats préliminaires montrent que l'absence de lymphocytes B (toutes sous-populations confondues; souris JHD) n'affecte pas la protection des souris par l'AcM Chi-Tn contre la tumeur (appuyant les résultats de l'Article 1, Fig 4B), alors que les lymphocytes B semblaient impliqués dans les synapses-ADCC observées par microscopie (Article 1, Fig. 5C). Au contraire, les lymphocytes T semblent strictement nécessaires à l'effet antitumoral du traitement par l'AcM Chi-Tn *in vivo*. En effet, nous n'observons plus d'effet antitumoral par Chi-Tn dans les souris Nude ou $Rag^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes T), ou $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ (déficientes en lymphocytes T et NK) (Figure supplémentaire). Ainsi, l'effet thérapeutique de l'AcM Chi-Tn fait intervenir, à la fois des cellules effectrices $RFc\gamma^{+}$, et des lymphocytes T. Curieusement, par microscopie, nous n'avons pas observé d'interaction entre les lymphocytes T et les cellules tumorales.

Ces résultats confirment le rôle des effecteurs immunitaires exprimant des récepteurs RFcγ activateurs (macrophages...), mais ce ne sont pas les seules populations puisque nos résultats montrent le rôle indispensable de la réponse immune adaptative (lymphocytes T) pour assurer l'effet thérapeutique de l'AcM, comme cela avait été montré par ailleurs pour le trastuzumab (Park S, 2010). Etant donné que les lymphocytes T n'expriment pas de RFcγ et que nous n'avons pas observé de synapses entre ces cellules et les cellules tumorales TA3Ha, il peut être suggéré que les lymphocytes T soient activés suite à la présentation d'antigènes provenant des cellules tumorales, soit par les macrophages ayant phagocyté les cellules tumorales (puisqu'ils expriment les molécules du CMH de classe I et II), soit par les cellules dendritiques (DC), professionnelles du priming efficace des réponses T. Les DC exprimant des RFcγ activateurs sont capables de reconnaître les cellules tumorales ayant fixé l'AcM Chi-Tn, de les endocyter, les processer et enfin de présenter à leur surface des peptides en association au CMH. De plus, les cellules effectrices $RFc\gamma^{+}$ après activation par la reconnaissance des cellules tumorales opsonisées via leur RFcγ, en plus de leur propre activité cytotoxique et/ou phagocytaire, sont capables de produire des cytokines ou des signaux de dangers qui vont agir sur la réponse immune adaptative. Un exemple de signal de danger est la protéine HMGB-1 (*High Mobility Group Box*) qui peut être libérée par les monocytes activés (Gardella S, 2002) mais également relarguée par les cellules tumorales traitées par certaines chimiothérapies dont la CTX. Ensuite, il a été montré que HMGB-1 interagit avec le récepteur TLR-4 exprimé par les cellules dendritiques conduisant à une augmentation de la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Apetoh L, 2007). Il serait intéressant d'etudier si HMGB-1 est produite par les macrophages ayant été activés suite au contact avec les tumeurs opsonisées.
Les lymphocytes T activés pourraient intervenir dans l'effet antitumoral de l'AcM Chi-Tn par leur activité cytotoxique envers les cellules tumorales pour compléter les fonctions cytotoxiques des

effecteurs RFcγ$^+$, macrophages ou neutrophiles. Ils pourraient également être impliqués dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales pendant toute la durée du traitement grâce à leur propriété de cellules mémoires. En effet, bien que 48h après une injection de Chi-Tn, on n'observe plus (ou très peu) de cellules TA3Ha-GFP dans la cavité péritonéale, nous avons constaté que le traitement par la CTX+Chi-Tn doit être maintenu 2 fois par semaine pendant 3 semaines pour être efficace. Les souris sont alors protégées contre une nouvelle injection de cellules tumorales.

Il serait également intéressant de déterminer l'implication des cellules NK ainsi que des neutrophiles dans la réponse antitumorale *in vivo*.

## D. Rôle des récepteurs RFcγ

Il existe quatre fonctions cellulaires découlant de l'activation des récepteurs RFcγ, suivant le type de la cellule et des récepteurs RFcγ qu'elle possède : l'ADCC, la phagocytose, la présentation antigénique, et la sécrétion de facteurs solubles.

L'ADCC est exercée principalement par les macrophages, les cellules NK et les neutrophiles. Par exemple, la cellule NK se lie à une cellule opsonisée par des anticorps de type IgG, puis libère des granules cytotoxiques cytoplasmiques, chargés de perforine et de granzyme, entrainant la mort de la cellule cible. La phagocytose est exercée par des cellules phagocytaires professionnelles telles que les macrophages et les neutrophiles, et a lieu en présence de cellules ou de débris cellulaires préalablement opsonisés par des anticorps de type IgG. Lors de la présentation antigénique, les cellules dendritiques endocytent des particules antigéniques opsonisées par l'intermédiaire de leurs récepteurs RFcγ, les dégradent puis les présentent sous forme de peptides associés à des molécules du CMH. Cela permet ainsi d'activer une réponse immunitaire adaptative. Enfin, la sécrétion de facteurs solubles, tels que les cytokines (IFN-γ, IL-10) ou les substances vasoactives, est un mécanisme activé par les récepteurs RFcγ, qui permet notamment de moduler la réponse immunitaire.

Ainsi, les récepteurs RFcγ interviennent dans de nombreux mécanismes immunitaires. Dans nos expériences de survie *in vivo*, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn, associé à la CTX, induit le rejet de la tumeur TA3Ha dans plus de 80% des souris, par un mécanisme dépendant des RFcγ mais indépendant du RFcγIIB. Nous avons ensuite montré que les cellules tumorales forment des conjugués des effecteurs RFcγ$^+$ tels que les macrophages et les neutrophiles, suggérant un mécanisme d'ADCC et/ou de phagocytose.

## E. Limites de notre modèle expérimental de tumeur murine *in vivo*

Le protocole opératoire appliqué à nos expériences *in vivo* peut être discuté sur plusieurs points.

*1) Type de tumeur :* Tout d'abord, notre modèle expérimental peut être discuté du fait que les cellules tumorales TA3Ha prolifèrent en suspension dans le péritoine entraînant des ascites. Un modèle de tumeur solide serait complémentaire à nos expériences, et permettrait de suivre plus aisément et précisément la croissance tumorale par mesure du volume de la tumeur au cours du traitement. Malheureusement, les cellules TA3Ha ne peuvent pas être utilisées comme modèle de tumeur solide, car elles ne prolifèrent pas lorsqu'elles sont greffées en sous-cutané. Il serait donc intéressant de trouver d'autres modèles cellulaires, mais très peu de cellules tumorales murines exprimant l'antigène Tn ont été répertoriées.

*2) Voie d'injection :* Dans notre modèle expérimental, les cellules tumorales ainsi que le traitement (CTX et AcM Chi-Tn) sont tous les deux injectés aux souris par voie intrapéritonéale, créant une situation particulière, puisque tous les « éléments » se retrouvent localisés dans l'espace restreint et bien délimité de la cavité péritonéale, et peuvent donc interagir facilement entre eux et avec le microenvironnement. De plus, les produits du traitement (AcM Chi-Tn et/ou CTX) ne nécessitent probablement pas de circulation de l'AcM et/ou de la CTX dans la souris comme ce serait le cas pour une tumeur solide administrée par voie intradermique ou sous-cutanée. Il s'agit donc d'un contexte favorable, différent de celui d'une tumeur sous-cutanée, où les traitements sont injectés par voie intra-veineuse ou en intra-péritonéale, et où les réactifs sont donc très dilués avant d'arriver au site de la tumeur.

*3) Protocole de traitement :* Dans la plupart des expériences menées chez les souris, le traitement est appliqué dans un schéma de type prophylactique ; dans un plus petit nombre, le traitement commence le jour de la greffe de la tumeur ; et ce n'est que dans de plus rares études que le traitement débute plus de 10 jours après l'inoculation du cancer, dans un schéma de type thérapeutique. Le plus souvent, dans ces modèles, les souris meurent 4 à 6 semaines après l'inoculation de la tumeur. L'intervalle pendant lequel le traitement peut agir est donc extrêmement étroit. Dans les expériences *in vivo* menées au cours de ce projet de thèse, le protocole utilisé est de type thérapeutique, car le traitement est commencé après l'administration des cellules tumorales. Cependant, les conditions restent éloignées de celles rencontrées chez les patients car le traitement

est commencé rapidement après l'inoculation de la tumeur (le lendemain et le jour suivant), donc avant que la tumeur ne soit réellement établie.

*4) Rôle indispensable de la CTX :* Enfin, dans notre modèle thérapeutique *in vivo*, l'AcM Chi-Tn utilisé seul n'est que très peu efficace et les synapses formées en absence de CTX ne sont pas suffisantes par elles-mêmes pour induire la mort des cellules tumorales TA3Ha. Il est donc indispensable d'associer la chimiothérapie par la CTX au traitement par Chi-Tn bien qu'une unique injection soit suffisante sur toute la durée du traitement par l'AcM Chi-Tn. C'est pourquoi, il serait intéressant de connaître le rôle exact joué par la chimiothérapie dans l'effet thérapeutique de l'AcM Chi-Tn *in vivo* (Cf. paragraphe suivant).

## F. Rôle de la CTX dans l'effet thérapeutique de l'AcM Chi-Tn *in vivo*

La question la plus intriguante, et toujours non résolue, est la nécessité de combiner la cyclophosphamide (CTX) avec l'AcM Chi-Tn pour obtenir un effet antitumoral. La synergie de certaines chimiothérapies avec des AcM thérapeutiques est maintenant bien démontrée cliniquement, mais les bases moléculaires de ce phénomène sont toujours inconnues (Adams G, 2005). La CTX pourrait agir à deux niveaux, non exclusifs: sur les cellules tumorales et/ou sur les cellules du système immunitaire.

*1) Rôle de la CTX sur les cellules tumorales :* Une explication pourrait être que la CTX sensibilise les cellules tumorales à leur destruction par les cellules du système immunitaire, notamment les cellules NK et les lymphocytes T $CD8^+$ (van der Most R, 2009). Une autre hypothèse intéressante est que la CTX induit la production de cytokines qui à leur tour pourraient amorcer et/ou activer les effecteurs du système immunitaire pour détruire les tumeurs par ADCC (Proietti E, 1998). Cette idée est confirmée par nos observations que, en l'absence de CTX, les synapses ne sont pas suffisantes par elles-mêmes pour induire la mort des cellules tumorales. Cependant, les travaux d'Albanesi M. *et al.* (2012) ont montré récemment, dans un modèle *in vivo* de mélanome B16 métastasique, que la combinaison de la CTX avec l'AcM anti-gp75 TA99, ne donnait pas de meilleurs résultats thérapeutiques que l'AcM utilisé seul.

*2) Rôle de la CTX sur les populations immunes :* Un autre point intéressant à analyser concerne la cinétique d'injection de la CTX par rapport à celle de l'AcM Chi-Tn, qui pourrait être crucial en modifiant l'infiltration de la tumeur ou du microenvironnement entourant le site d'injection des

cellules tumorales par les cellules immunitaires et en stimulant les réponses antitumorales, avant que la tumeur ne soit réellement établie (Fung P, 1990). Plusieurs études ont montré que la réponse immune et l'activité antitumorale induites lors d'essais de vaccination pouvaient être améliorées en traitant les souris avec la CTX (Ghiringhelli F, 2004; Hirschhorn-Cymerman D, 2009; Berraondo P, 2007). La CTX induit une lymphopénie et élimine des populations de cellules suppressives telles que les lymphocytes T régulateurs (Awwad M, 1988; Ghiringhelli F, 2004; Lutsiak M, 2005) ou d'autres populations indépendamment des lymphocytes T.

Toutefois, l'effet collaboratif entre la CTX et l'AcM Chi-Tn n'est peut être pas lié à un mécanisme d'action spécifique de la CTX car nous avons également pu mettre en évidence que la CTX n'était pas la seule chimiothérapie capable de potentialiser l'effet antitumoral de l'anticorps Chi-Tn. En effet, d'autres molécules, comme les taxanes: Docétaxel et Paclitaxel, ont montré un effet bénéfique sur l'activité antitumorale de l'AcM Chi-Tn dans le même modèle expérimental (résultats non publiés), alors que la CTX et les taxanes n'ont pas le même mode d'action qui est basé sur le cross-linking de l'ADN ou sur le blocage des microtubules du fuseau mitotique, respectivement. L'équipe de Merlin JL *et al.* (2002) a montré *in vitro* que ces deux taxanes (Paclitaxel et Docetaxel) agissent en synergie avec le trastuzumab sur les lignées humaines de cancer du sein surexprimant HER2: MCF-7, MDAMB-453 et SKBR-3. De la même façon, l'équipe de Pegram M. *et al.* (2004) a montré que la Carboplatine, la CTX, le Docetaxel et la Vinorelbine augmentent l'efficacité du trastuzumab sur d'autres lignées humaines mammaires $HER2^{+}$: SKBR-3, BT-474, MDAMB-361 et MDAMB-453.

Le concept de mort cellulaire immunogène est un type particulier d'apoptose stimulant les réponses immunitaires antitumorales (Vacchelli E, 2013). En effet, l'équipe de Zitvogel L. *et al.* a largement montré que les cellules tumorales exposées à la CTX ou aux anthracyclines, telles que la Doxorubicine et l'Oxaliplatine, sont capables de vacciner les souris contre une greffe ultérieure de ces cellules tumorales (Casares N, 2005; Sistigu A, 2011; Zitvogel L, 2011). Dans notre modèle, l'effet de la CTX n'est pas lié à une mort cellulaire immunogène, puisque l'Oxaliplatine, classée également dans cette même catégorie, n'a pas d'effet bénéfique sur l'activité antitumorale de l'AcM Chi-Tn, tandis que les taxanes qui n'induisent pas de "mort immunogénique" des tumeurs permettent d'assurer l'effet antitumoral de l'AcM Chi-Tn dans notre modèle.

La caractérisation des mécanismes moléculaires par lesquels la CTX participe à l'effet antitumoral de l'AcM Chi-Tn *in vivo* et la caractérisation de la voie par laquelle ces mécanismes stimulent les effecteurs de l'ADCC seraient des points intéressants à étudier.

Ainsi, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn spécifique des tumeurs Tn-positives, en association avec la CTX, inhibait la croissance des cellules tumorales *in vivo* par un mécanisme d'ADCC. Notre travail est donc en accord avec les précédentes études qui suggèrent que l'ADCC est impliquée dans les réponses antitumorales dépendantes des anticorps (Clynes R, 2000; Minard-Collin V, 20008; De Haij S, 2010; Cartron G, 2002). De plus, notre travail montre également pour la première fois, la présence de synapses-ADCC *in vivo* entre les cellules tumorales et les cellules effectrices.

## G. Vaccination spécifique de l'antigène Tn

Nous avons vu que l'AcM Chi-Tn est un bon candidat pour le traitement des cancers Tn+ par immunothérapie passive. Une autre stratégie anticancéreuse est l'immunothérapie active par vaccination. Celle-ci entraîne une réponse anticorps, mais peut aussi entraîner des réponses T.

- *Réponse anticorps* : La présence de concentrations variables d'autoanticorps anti-Tn, aussi bien dans le sang de donneurs sains que dans le sang de patients atteints de cancer, a suggéré l'utilisation de l'antigène Tn en immunothérapie active antitumorale afin de stimuler les réponses antitumorales des patients. L'immunothérapie active par vaccination a donné des résultats positifs dans des modèles animaux (Lo-Man R, 1999) et dans certains essais cliniques (Springer G, 1995; Slovin S, 2003, 2005). De nombreuses approches différentes ont été suggérées, comme par exemple, les clusters sunthétiques d'antigènes Tn (De Silva R, 2009), les préparations de mucines (OSM; O'Boyle K, 2006), et les glycopeptides (Kunz H, 2003). L'immunisation de souris avec un antigène Tn synthétique ou des mucines partiellement déglycosylées induit une réponse anticorps anti-Tn de type IgG et IgM permettant d'inhiber la croissance d'une tumeur de carcinome mammaire invasive exprimant l'antigène Tn (Lo-Man R, 2001, 2004; Singhal A, 1991; Freire T, 2006; Kunz H, 2003).

- *Réponse T* : Par exemple, le candidat-vaccin MAG-Tn3 est composé d'un glycopeptide contenant trois versions consécutives de l'antigène Tn associées à un peptide PV (dérivé du poliovirus type 1) contenant un épitope T $CD4^+$ capable de stimuler les réponses immunitaires cellulaires, notamment les réponses des lymphocytes T auxilliaires. Une vaccination prophylactique avec le MAG-Tn3 protège les souris contre l'apparition d'une tumeur dans 70 à 90 % des cas, tandis qu'une vaccination thérapeutique permet le rejet de la tumeur dans 70 à 80% des cas. Cette protection est abolie chez les souris déplétées en cellules T $CD4^+$, montrant que ces lymphocytes T auxilliaires sont indispensables pour induire la production d'anticorps anti-Tn (Lo-Man R, 2001). Un autre

exemple est celui du candidat vaccin MUC6-Tn dans lequel la glycosylation de l'antigène Tn affecte l'immunogénicité du composé en inhibant partiellement les réponses cellulaires Th1, et en favorisant les cellules Th17 productrices d'IL-17, contribuant ainsi à une immunité antitumorale par le recrutement de cellules effectrices dans le microenvironnement tumoral (Freire T, 2011).

La vaccination par l'antigène Tn doit induire une réponse immune et en particulier la production d'anticorps capables de se fixer aux cellules tumorales. Ces anticorps sont de spécificités différentes (polyclonaux), contrairement à ceux utilisés en immunothérapie passive, qui sont monoclonaux et d'un isotype permettant des intéractions efficaces avec les récepteurs RFcγ des cellules effectrices impliquées dans l'ADCC. Les AcM thérapeutiques sont bien caractérisés, et peuvent éventuellement être modifiés afin d'optimiser leurs caractéristiques d'affinité et d'avidité pour l'antigène cible.

## II. L'AcM Chi-Tn comme vecteur d'agents cytotoxiques

Dans une deuxième partie, nous avons exploré la possibilité d'utiliser l'AcM Chi-Tn couplé comme vecteur d'agents cytotoxiques spécifique des cellules Tn-positives.

### A. Internalisation de l'AcM Chi-Tn *in vitro*

Dans un modèle de tumeurs solides sous-cutanées Shin-3 (carcinome ovarien humain) chez la souris nude, nos expériences de biodistribution *in vivo* montrent que l'AcM Chi-Tn est capable de cibler spécifiquement les zones tumorales Tn-positives, et ne se fixe pas aux tissus sains, ce qui en fait un anticorps potentiellement utilisable comme vecteur de molécules cytotoxiques.
L'internalisation du complexe anticorps/antigène cible est un pré-requis nécessaire à l'utilisation de l'anticorps sous forme de conjugué (ADC). La plupart des ADCs sont internalisés et ciblés dans les lysosomes où la molécule toxique est libérée afin de détruire la cellule cible (Chari R, 2008 ; Teicher B, 2009). Dans cette thèse, nous avons montré *in vitro* que l'AcM Chi-Tn est rapidement internalisé dans les endosomes précoces et de recyclage où il reste pendant un temps relativement long d'au moins 4h, faisant de cet AcM un bon candidat comme vecteur pour cibler spécifiquement des molécules cytotoxiques dans la tumeur. Cette propriété de localisation intracellulaire semble indépendante du niveau d'expression de l'antigène Tn de la cellule tumorale, puisque nous avons obtenu des résultats similaires en utilisant plusieurs lignées cellulaires, exprimant différents niveaux

d'expression de l'antigène Tn, avec des niveaux croissants depuis les lignées humaines Ovcar-3 et Shin-3, la lignée murine TA3Ha, jusqu'à la lignée humaine Jurkat. Néammoins, il serait intéressant de déterminer si cette propriété de localisation intracellulaire est spécifique de la protéine cellulaire portant l'antigène Tn, de l'AcM Chi-Tn lui-même (dont l'affinité est plus faible que celle de l'AcM murin originel 83D4) ou de la cible Tn. Avec une affinité identique (même faible), deux anticorps peuvent avoir des efficacités antitumorales totalement différentes, mais l'internalisation de l'anticorps semble jouer un rôle important (Pietersz G, 1997). Il serait notamment intéressant de réaliser ces expériences de localisation intracellulaire avec d'autres anticorps anti-Tn, mais aussi avec l'anticorps parental de l'AcM Chi-Tn : l'IgM murine 83D4.

En revanche, nous n'avons pas détecté d'AcM dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Une hypothèse pourrait être qu'il est dégradé rapidement après internalisation, et que l'on se retrouve donc en dessous de la limite de détection. Il n'est donc pas exclut que l'AcM Chi-Tn puisse atteindre les endosomes tardifs et lysosomes. De plus, d'autres anticorps thérapeutiques, décrits comme ciblant les endosomes précoces et de recyclage, ont été utilisés en tant qu'immunoconjugués. Par exemple, l'AcM R24, ciblant le ganglioside GD3 surexprimé par les cellules cancéreuses (mélanomes, carcinomes), est rapidement internalisé dans les endosomes précoces, puis s'accumule au niveau des endosomes de recyclage. Il a été montré *in vitro* que l'AcM R24 couplé à la saporine était capable d'inhiber la croissance des cellules exprimant GD3 (Torres Demichelis V, 2013).

## B. Couplage de l'AcM Chi-Tn à des molécules toxiques

Durant ce projet de thèse, l'AcM Chi-Tn a été couplé à la toxine saporine (SAP) ou à la molécule cytotoxique monométhyl-auristatine F (MMAF), et son efficacité a été testée *in vitro*.

*Saporine :* L'AcM Chi-Tn a dans un premier temps été couplé à la saporine, une toxine végétale inactivant les ribosomes et largement utilisée pour inhiber la croissance de cellules tumorales (Polito L, 2011). Cette toxine possède l'avantage d'être stable, de conserver son activité enzymatique après couplage, et de résister à la dégradation protéolytique. Testé *in vitro*, le conjugué Chi-Tn/SAP s'est révélé cytotoxique pour les lignées cellulaires Tn-positives TA3Ha et Jurkat, mais pas sur la lignée Tn-négative EL-4, montrant que la toxine est bien libérée dans la cellule, dans un compartiment intracellulaire adapté à son mécanisme d'action. En revanche, testé *in vivo*, l'AcM Chi-Tn/SAP s'est avéré très toxique pour les souris, même à des faibles doses précédemment

décrites (Pastan I, 2006), nous obligeant à abandonner cette toxine et à nous tourner vers d'autres molécules toxiques.

*SN-38 et MMAE :* Nous avons alors décidé de coupler avec un même espaceur l'AcM Chi-Tn au SN-38, un puissant inhibiteur de topoisomérase I, et à la monométhyl-auristatine E (MMAE), un antimitotique très puissant capable d'inhiber de façon très efficace la polymérisation de la tubuline. Cependant, testés *in vitro*, ces conjugués Chi-Tn/SN-38 et Chi-Tn/MMAF n'ont pas montré d'effet toxique spécifique de la cible Tn, probablement du fait d'un espaceur inadapté (résultats non montrés).

*MMAF :* Nous avons donc choisi de coupler l'AcM Chi-Tn à la monométhyl-aurstatine F (MMAF) en utilisant un autre linker plus adapté. Étant donné que l'AcM Chi-Tn nu est principalement internalisé dans les endosomes précoces, nous avons choisi d'utiliser un espaceur maléimidocaproyl préotéase-indépendant, décrit précédemment dans des conjugués auristatine (Doronina S, 2006; Jackson D, 2008). Testé *in vitro*, l'immunoconjugué Chi-Tn/MMAF possède une action cytotoxique sur les cellules Jurkat *in vitro*, mais pas sur les cellules Tn-négatives SKBR3, montrant que la molécule toxique est efficacement libérée à l'intérieur de la cellule, et que l'effet cytotoxique est spécifique de l'antigène Tn.

Ainsi, ces expériences nous ont permis d'étudier l'effet antitumoral de l'AcM Chi-Tn une fois couplé à une molécule toxique. L'effet cytotoxique *in vitro* des deux conjugués Chi-Tn/SAP et Chi-Tn/MMAF montre que la délivrance de la molécule toxique dans les endosomes précoces est donc suffisante pour induire l'arrêt de la croissance tumorale *in vitro*. Nos résultats montrent pour la première fois l'utilisation d'un anticorps anti-Tn en tant qu'immunoconjugué.
Des expériences complémentaires chez la souris sont actuellement en cours afin de déterminer l'effet antitumoral *in vivo* du conjugué Chi-Tn/MMAF.

### C. Affinité de l'AcM Chi-Tn

L'affinité de l'anticorps Chi-Tn (2,2 x $10^{-8}$ M) pour l'antigène Tn n'est pas très élevée (Oppezzo P, 2000) suggérant que cela constitue un obstacle à l'efficacité de l'anticorps. Cependant, avec une affinité identique, même faible, deux anticorps peuvent avoir des efficacités antitumorales totalement différentes (Pietersz G, 1997). Par ailleurs, l'équipe de Rudnick S. *et al.* a montré qu'une haute affinité de l'AcM pour son antigène cible entrainait une internalisation et une dégradation

rapide de l'AcM, diminuant ainsi la quantité d'AcM disponible pour diffuser en profondeur dans la tumeur (Rudnick S, 2011). Ainsi, les AcM de haute affinité tels que le trastuzumab, sont fortement dégradés *in vitro* par les cellules tumorales, et présentent une pénétration limitée de la tumeur *in vivo*.

## D. Autres possibilités de couplage de l'AcM Chi-Tn

*Eléments radioactifs :* L'AcM Chi-Tn pourrait aussi être conjugué à un isotope radioactif ($^{131}$iodine, $^{90}$yttrium, $^{186}$rhodium, $^{188}$rhodium…) afin de lui conférer la capacité de délivrer des radiations ionisantes (α, β, γ) directement dans la tumeur, permettant ainsi d'améliorer son action sur les cellules cancéreuses. Les radionucléides émettant des radiations α ($^{212}$bismuth, $^{213}$bismuth et $^{211}$astatine) sont particulièrement intéressants car ils émettent des radiations hautement toxiques sur de très faibles distances (< 100 µm) leur permettant d'avoir une action très localisée. Cependant, la difficulté de couplage et la lourdeur des manipulations représentent un obstacle majeur à l'utilisation de ces AcM conjugués (Carter P, 2001; Christiansen J, 2004; Chari R, 2008).

*Cytokine :* Le couplage de l'AcM Chi-Tn avec une cytokine, telle que l'interleukine IL-2 ou IL-12 pourrait également être envisagé. L'immuno-cytokine ainsi fabriquée permettrait de créer de fortes concentrations intra-tumorales de cytokines stimulant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (lymphocytes T et B, cellules NK) (Carter P, 2001).

*Nanoparticules d'or :* L'AcM Chi-Tn pourrait également être utilisé en photothermie. Mise au point dans les années 1990 par Halas N, la photothermie est un traitement du cancer qui utilise des nanoparticules d'or (bâtonnets d'or, ou nanorods) de 1 à 100 nm, conçues pour réagir avec une lumière à une fréquence très spécifique, afin de détruire les tumeurs par émission localisée de chaleur, sans affecter le tissu sain. L'avantage de cette technique est que les nanoparticules d'or ne laissent pas de trace toxique dans l'organisme, ne s'accumulent pas dans les tissus sains, et n'ont aucun effet sur le système immunitaire, contrairement aux chimiothérapies classiques. De plus, le laser n'endommage pas les tissus sains, ce qui rend cette nouvelle technique potentiellement intéressante. (Huang X, 2006 ; Samim M, 2011). Actuellement, une collaboration est en cours avec Semetey V. de l'Institut Curie afin de coupler l'AcM Chi-Tn à des bâtonnets d'or pour une utilisation en photothermie.

*Sondes de diagnostic :* Autre possibilité, l'AcM Chi-Tn pourrait aussi être couplé à des sondes afin de l'utiliser en imagerie immunodiagnostique des tumeurs *in vivo* chez les patients.

### E. Anticorps recombinants

Les AcM de type IgG migrent facilement des vaisseaux sanguins vers les tissus cancéreux cibles. L'efficacité de ces AcM sur ces tissus dépend de nombreux facteurs tels que les caractéristiques de diffusion de l'AcM, elles-mêmes déterminées par sa taille, sa charge et son affinité pour sa cible, mais aussi par la concentration de l'antigène cible dans le tissu cancéreux. Une affinité et un nombre d'antigènes élevés favorisent la fixation de l'AcM près du vaisseau et très peu à l'intérieur du tissu tumoral (Rudnick S, 2011). En revanche, une faible affinité et un nombre limité d'antigènes s'avèrent inadéquats pour provoquer un effet thérapeutique (Austin C, 2004). Ainsi, il pourrait être envisagé de réaliser des Ac recombinants correspondant à de petites constructions de faible masse moléculaire, telles que les fragments variables simple-chaîne (scFvs, *single-chain Fv fragments*), afin d'améliorer la pénétration de l'AcM Chi-Tn à l'intérieur des tissus cancéreux. Cependant, la demi-vie *in vivo* de ces scFvs est courte si on la compare à celle des molécules à structure IgG complète, et leur affinité pour l'antigène est en général plus faible que celle de l'AcM natif (Allen T, 2002; Austin C, 2004).

## Conclusion générale

Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'AcM Chi-Tn seul ne possède pas d'effet toxique direct sur les lignées de cellules tumorales Tn-positives *in vitro*. Cependant, en présence de macrophages, cet AcM est capable d'induire la lyse de ces cellules par un mécanisme d'ADCC. *In vivo*, l'AcM Chi-Tn, associé à la cyclophosphamide, induit le rejet d'une tumeur du sein dans plus de 80% des souris par un mécanisme d'ADCC dépendant des récepteurs RFcγ. Nous avons observé par microscopie que les cellules tumorales forment *in vivo* des synapses avec des macrophages, des neutrophiles, mais aussi des lymphocytes B. Des expériences de survie *in vivo* chez des souris déficientes pour différentes populations cellulaires montrent que les lymphocytes T semblent également nécessaires à la protection des souris par l'AcM Chi-Tn contre la tumeur, contrairement aux lymphocytes B. Ainsi, ces résultats confirment le rôle des effecteurs exprimant des récepteurs RFcγ activateurs, mais aussi le rôle indispensable de la réponse immune adaptative, et notamment des lymphocytes T, pour assurer l'effet thérapeutique des AcM.

Nous avons également montré que l'AcM Chi-Tn pouvait être utilisé comme vecteur d'agents cytotoxiques. *In vivo*, dans un modèle de tumeurs solides chez la souris, des expériences de biodistribution montrent que l'AcM Chi-Tn est capable de cibler spécifiquement les zones tumorales. Nous avons montré *in vitro* que l'AcM Chi-Tn est internalisé dans les endosomes précoces et de recyclage pendant un temps relativement long, faisant de cet AcM un bon candidat pour être couplé à des agents cytotoxiques. Enfin, nous avons couplé l'AcM Chi-Tn à la toxine saporine ou à la molécule cytotoxique auristatine F, et nous avons montré *in vitro* que ces conjugués sont cytotoxiques sur des lignées cellulaires Tn-positives.

Ainsi, par ces différents résultats de thèse, nous avons démontré que l'AcM Chi-Tn était un bon candidat pour le traitement des cancers épithéliaux par immunothérapie passive, et qu'il pouvait être utilisé aussi bien « nu » que couplé à une molécule cytotoxique.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


ADAIR JR, HOWARD PW, HARTLEY JA, *et al.* **Antibody-drug conjugates - a perfect synergy.** *Expert Opin Biol Ther,* 2012, 12(9), 1191-206.

ADAMS GP, WEINER LM. **Monoclonal antibody therapy of cancer.** *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9):1147-57.

AIT SARKOUH R. **Synthèse de conjugués avec la toxine de Shiga pour des thérapies anticancéreuses ciblées et la détection de tumeurs par IRM**. Thèse de doctorat en Chimie Thérapeutique. Paris : Université Paris Descartes, 2012.

ALBANESI M, MANCARDI DA, MACDONALD LE, *et al.* **Cutting edge: FcγRIII (CD16) and FcγRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75 monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma**. *J Immunol,* 2012, 189(12):5513-7.

ALLEN T.M. **Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy.** *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 750-63.

ALLER CT, KUCUK O, SPRINGER GF, *et al.* **Flow cytometric analysis of T and Tn epitopes on chronic lymphocytic leukemia cells.** *Am J Hemato,*. 1996, 52(1):29-38.

ANDO H, MATSUSHITA T, WAKITANI M, *et al*. **Mouse-human chimeric anti-Tn IgG1 induced anti-tumor activity against Jurkat cells in vitro and in vivo.** *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(9), 1739-44.

APETOH L, GHIRINGHELLI F, TESNIERE A, *et al.* **The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy.** *Immunol Rev,* 2007, 220:47-59.

ASUNDI J, REED C, ARCA J, *et al.* **An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma.** *Clin Cancer Res*, 2011, 17(5):965-75.

AUSTIN C.A, DE MAZIERE A.M, PISACANE P.I. *et al*. **Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics Trastuzumab and Geldanamycin.** *Mol. Biol. Cell*, 2004, 15, 5268-82.

AVICHEZER D, SPRINGER GF, SCHECHTER B, *et al.* **Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model.** *Int J Cancer*, 1997, 72:119-27.

AWWAD M, R J North. **Cyclophosphamide (Cy)-facilitated adoptive immunotherapy of a Cy-resistant tumour. Evidence that Cy permits the expression of adoptive T-cell mediated immunity by removing suppressor T cells rather than by reducing tumour burden.** *Immunology*. 1988, 65(1): 87-92.

BAREFORD L.M., SWAAN P.W. **Endocytic mechanisms for targeted drug delivery**. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, 59, 748-58.

BAROK M, ISOLA J, PÁLYI-KREKK Z, *et al.* **Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance.** *Mol Cancer Ther,* 2007, 6(7), 2065-72.

BEITZ JG, DAVOL P, CLARK JW, *et al.* **Antitumor activity of basic fibroblast growth factor-saporin mitotoxin in vitro and in vivo.** *Cancer Res,* 1992, 52(1):227-30.

BELLET D, DANGLES-MARIE V. **Immunothérapie des cancers : des mécanismes de défense contre les tumeurs aux applications cliniques.** Les colloques de l'Institut Servier. Le cancer : nouvelles données, nouvelles stratégies, nouveaux espoirs. Editions Elservier, 2004, 34-48.

BERRAONDO P, NOUZE C, PREVILLE X, *et al.* **Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system.** Cancer Res, 2007, 67(18):8847-55.

BEUZELIN-YVRAUT M, BOURGUIGNAT A, PHILLIPS E, *et al.* **Immunocytological analysis of the Tn associated antigen 83D4 in serous effusions from patients with cancer: comparison with Tn soluble glycoprotein.** *J Clin Pathol,* 1995, 48:433-7.

BEVAART L, JANSEN MJ, VAN VUGT MJ, *et al.* **The high-affinity IgG receptor, FcgammaRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma.** *Cancer Res,* 2006, 66(3):1261-4.

BODER ET, JIANG W. **Engineering antibodies for cancer therapy.** *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2, 53-75.

BOON T, DE PLAEN E, LURQUIN C, *et al.* **Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes.** *Cancer Surv,* 1992, 13:23-37.

BRAHMER JR, DRAKE CG, WOLLNER I, *et al.* **Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates.** *J Clin Oncol,* 2010, 28(19):3167-75.

BRAHMER JR, TYKODI SS, CHOW LQ, *et al.* **Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.** *N Engl J Med*, 2012, 366(26):2455-65.

BRAHMER JR. **Harnessing the immune system for the treatment of non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol,* 2013, 31(8):1021-8.

BROOKS SA. **The involvement of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression.** *Histol Histopathol*, 2000, 15(1), 143-58.

BROOKS SA, HALL DM, BULEY I. **GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane.** *Br J Cancer*, 2001, 85(7), 1014-22.

BROOKS SA, WILKINSON D. **Validation of a simple avidin-biotin detection method for Helix pomatia lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer.** *Acta Histochem*. 2003, 105(3), 205-12.

BROOKS SA, CARTER TM, ROYLE L, *et al.* **Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies.** *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(1):2-21.

BRUHNS P, IANNASCOLI B, ENGLAND P, *et al.* **Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses.** *Blood,* 2009, 113(16), 3716-25.

BURCH PA, BREEN JK, BUCKNER JC, *et al*. **Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer**. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(6), 2175-82.

BURDEN RE, CASWELL J, FAY F, *et al.* **Recent advances in the application of antibodies as therapeutics.** *Future Med Chem,* 2012, 4(1), 73-86.

BURNET FM. **Cancer a biological approach.** *Br Med J*, 1957, 1:841-7.

BURNET FM. **Immunological surveillance in neoplasia.** *Transplant Rev*, 1971, 7:3-25.

BURRIS HA. **Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer.** *Expert Opin Biol Ther.* 2011, 11(6), 807-19.

CAO Y, STOSIEK P, SPRINGER GF, *et al.* **Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study.** *Histochem Cell Biol*, 1996, 106(2), 197-207.

CAPIETTO AH, MARTINET L, FOURNIÉ JJ. **Stimulated γδ T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer.** *J Immunol*, 2011, 187(2), 1031-8.

CARTER P. **Improving the efficacity of antibody-based cancer therapies.** *Nat. Rev. cancer,* 2001, 1(2), 118-29.

CARTER JJ, FEINGOLD DL, OH A, *et al.* **Perioperative immunomodulation with Flt3 kinase ligand or a whole tumor cell vaccine is associated with a reduction in lung metastasis formation after laparotomy in mice.** *Surg Innov,* 2006, 13(1), 41-7.

CARTRON G, DACHEUX L, SALLES G, *et al.* **Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene.** *Blood*, 2002, 99(3):754-8.

CASARES N, PEQUIGNOT MO, TESNIERE A, *et al.* **Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death.** *J Exp Med,* 2005, 202(12): 1691–1701.

CAVALLI V, CORTI M, GRUENBERG J. **Endocytosis and signaling cascades: a close encounter.** *FEBS Lett,* 2001, 498(2-3), 190-6.

CHARI RV. **Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs.** *Acc Chem Res.* 2008, 41(1), 98-107.

CHARPIN C, PANCINO G, OSINAGA E, *et al.* **Monoclonal antibody 83D4 immunoreactivity in human tissues: cellular distribution and microcytophotometric analysis of immunoprecipitates on tissue sections.** *Anticancer Res*, 1992, 12(1), 209-23.

CHEN Y, CLARK S, WONG T, *et al*. **Armed antibodies targeting the mucin repeats of the ovarian cancer antigen, MUC16, are highly efficacious in animal tumor models.** *Cancer Res*, 2007, 67(10):4924-32.

CHRISTIANSEN J, RAJASEKARAN AK. **Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy.** *Mol Cancer Ther.* 2004, 3(11), 1493-501.

CLYNES RA, TOWERS TL, PRESTA LG, *et al.* **Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.** *Nat Med,* 2000, 6(4), 443-6.

COQUELLE A, MOUHAMAD S, PEQUIGNOT MO, *et al.* **Enrichment of non-synchronized cells in the G1, S and G2 phases of the cell cycle for the study of apoptosis.** *Biochem Pharmacol,* 2006, 72(11), 1396-404.

CORREALE P, BOTTA C, CUSI MG, *et al.* **Cetuximab ± chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro.** *Int J Cancer*, 2012, 130(7), 1577-89.

CROCE MV, RABASSA ME, PRICE MR, *et al.* **MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma.** *Pathol Oncol Res*, 2001, 7:284-91.

DANUSSI C, COSLOVI A, CAMPA C, *et al.* **A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction.** *Glycobiology,* 2009, 19(10), 1056-67.

DE HAIJ S, JANSEN JH, BOROSS P, *et al*. **In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling.** *Cancer Res*, 2010, 70(8):3209-17.

DENG C, PAN B, O'CONNOR OA. **Brentuximab vedotin.** *Clin Cancer Res*, 2013, 19(1), 22-7.

DE SILVA RA, WANG Q, CHIDLEY T, *et al.* **Immunological response from an entirely carbohydrate antigen: design of synthetic vaccines based on Tn-PS A1 conjugates.** *J Am Chem Soc*, 2009, 131(28):9622-3.

DHODAPKAR KM, DHODAPKAR MV. **Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA,* 2005, 102(18), 6243-4.

DORONINA SO, TOKI BE, TORGOV MY, *et al.* **Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy.** *Nat Biotechnol,* 2003, 21(7):778-84.

DORONINA SO, MENDELSOHN BA, BOVEE TD, *et al.* **Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity.** *Bioconjug Chem*, 2006, 17(1), 114-24.

DUNN GP, BRUCE AT, IKEDA H, *et al*. **Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.** *Nat Immunol*, 2002, 3(11), 991-8.

DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.** *Immunity*, 2004, 21(2), 137-48.

EHRLICH P. **Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung.** *Ned Tijdschr Geneeskd*, 1909, 5:73–290.

EL HAGE F, ABOUZAHR-RIFAI S, MESLIN F, *et al.* **Immune response and cancer.** *Bull Cancer*, 2008, 95(1), 57-67.

ENDO Y, MITSUI K, MOTIZUKI M, *et al.* **The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins.** *J Biol Chem*, 1987, 262:5908-12.

ERICKSON HK, PARK PU, WIDDISON WC, *et al.* **Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing.** *Cancer Res*, 2006, 66(8):4426-33.

FALGUIÈRES T, LUYET PP, GRUENBERG J. **Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics.** *Exp Cell Res,* 2009, 315(9):1567-73.

FELDER S, MILLER K, MOEHREN G, *et al.* **Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body.** *Cell*, 1990, 61(4), 623-34.

FLORES M, DESAI DD, DOWNIE M, *et al.* **Dominant expression of the inhibitory FcgammaRIIB prevents antigen presentation by murine plasmacytoid dendritic cells.** *J Immunol*, 2009, 183(11), 7129-39.

FLYGARE JA, PILLOW TH, ARISTOFF P. **Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer.** *Chem Biol Drug Des,* 2013, 81(1):113-21.

FREIRE T, MEDEIROS A, REIS CA, *et al.* **Biochemical characterization of soluble Tn glycoproteins from malignant effusions of patients with carcinomas.** *Oncol Rep*, 2003, 10(5):1577-85.

FREIRE T, BAY S, VON MENSDORFF-POUILLY S, *et al.* **Molecular basis of incomplete O-glycan synthesis in MCF-7 breast cancer cells: putative role of MUC6 in Tn antigen expression.** *Cancer Res,* 2005, 65(17), 7880-7.

FREIRE T, BAY S, VICHIER-GUERRE S, *et al.* **Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer.** *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(12), 1357-73.

FREIRE T, LO-MAN R, PILLER F, *et al.* **Enzymatic large-scale synthesis of MUC6-Tn glycoconjugates for antitumor vaccination.** *Glycobiology*, 2006, 16(5), 390-401.

FREIRE T, LO-MAN R, BAY S, *et al.* **Tn glycosylation of the MUC6 protein modulates its immunogenicity and promotes the induction of Th17-biased T cell responses.** *J Biol Chem*, 2011, 286(10):7797-811.

FUNG PY, MADEJ M, KOGANTY RR, *et al.* **Active specific immunotherapy of a murine mammary adenocarcinoma using a synthetic tumor-associated glycoconjugate.** *Cancer Res*, 1990, 50(14):4308-14.

FUSTER MM, ESKO JD. **The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets.** *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(7), 526-42.

GALON J, COSTES A, SANCHEZ-CABO F, *et al.* **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.** *Science*, 2006, 313(5795):1960-4.

GARDELLA S, ANDREI C, FERRERA D, *et al.* **The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway.** *EMBO Rep*, 2002, 3(10):995-1001.

GERTNER-DARDENNE J, BONNAFOUS C, BEZOMBES C, *et al.* **Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies.** *Blood,* 2009, 113(20), 4875-84.

GHIRINGHELLI F, LARMONIER N, SCHMITT E, *et al.* **CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative.** *Eur J Immunol*, 2004, 34:336-344.

GILBOA E. **The makings of a tumor rejection antigen.** *Immunity*, 1999, 11(3), 263-70.

GIRI DK, ALI-SEYED M, LI LY, *et al.* **Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor.** *Mol Cell Biol,* 2005, 25(24), 11005-18.

GOVINDAN SV, GOLDENBERG DM. **New antibody conjugates in cancer therapy.** *ScientificWorldJournal,* 2010, 10, 2070-89.

GOVINDAN SV, GOLDENBERG DM. **Designing immunoconjugates for cancer therapy.** *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(7), 873-90.

GRANT BD, DONALDSON JG. **Pathways and mechanisms of endocytic recycling.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10:597-608.

GRUENBERG J, MAXFIELD FR. **Membrane transport in the endocytic pathway.** *Curr Opin Cell Biol,* 1995, 7(4), 552-63.

GUILLOT J, GUERRY M, KONSKA G, *et al.* **Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas.** *Bull Cancer*, 2004, 91(2), 141-58.

HAMBLETT KJ, SENTER PD, CHACE DF, *et al.* **Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate.** *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20):7063-70.

HARADA K, MIYAKE H, KURAHASHI T, *et al.* **Long-term complete response to very-low-dose interleukin-2 therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: report of two cases.** *Clin Exp Nephrol*, 2011, 15(6), 966-9.

HIRSCHHORN-CYMERMAN D, RIZZUTO GA, MERGHOUB T, *et al.* **OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis.** *J Exp Med,* 2009, 206(5):1103-16.

HODI FS, BUTLER M, OBLE DA, *et al.* **Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8), 3005-10.

HODI FS, O'DAY SJ, MCDERMOTT DF, *et al.* **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** *N Engl J Med*, 2010, 363(8), 711-23.

HORIKAWA M, MINARD-COLIN V, MATSUSHITA T, *et al*. **Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice.** *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4268–4280.

HRUBÝ M, KONÁK C, ULBRICH K. **Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin.** *J Control Release,* 2005, 103(1):137-48.

HUANG J, BYRD JC, SIDDIKI B, *et al*. **Monoclonal antibodies against partially deglycosylated colon cancer mucin that recognize Tn antigen.** *Dis Markers,* 1992, 10(2):81-94.

HUANG X, EL-SAYED IH, QIAN W, *et al.* **Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods.** *J Am Chem Soc*, 2006, 128(6), 2115-20.

HUBERT P, AMIGORENA S, OSINAGA E, *et al.* **An antibody specific for the Tn antigen for the treatment of cancer.** Brevet WO 2009/007222 A1. 2009.

HUBERT P, HEITZMANN A, VIEL S, *et al.* **Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy.** *Cancer Res,* 2011, 71(15), 5134-43.

HUBERT P, AMIGORENA S. **Antibody-dependent cell cytotoxicity in monoclonal antibody-mediated tumor immunotherapy.** *Oncoimmunology,* 2012, 1(1), 103-105.

IGLESIAS-BARTOLOME R, CRESPO PM, GOMEZ GA, *et al.* **The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. Inhibitory effect of brefeldin A and monensin.** *FEBS J*, 2006, 273(8):1744-58.

INOUE M, NAKADA H, TANAKA N, *et al.* **Tn antigen is expressed on leukosialin from T-lymphoid cells.** *Cancer Res,* 1994, 54(1):85-8.

ITZKOWITZ SH, YUAN M, MONTGOMERY CK, *et al.* **Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer.** *Cancer Res,* 1989, 49(1):197-204.

IYER U, KADAMBI VJ. **Antibody drug conjugates - Trojan horses in the war on cancer.** *J Pharmacol Toxicol Methods,* 2011, 64(3), 207-12.

JACKSON D, GOOYA J, MAO S, *et al.* A human antibody-drug conjugate targeting EphA2 inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 2008, 68(22):9367-74.

JOSHI T, GANESAN LP, CHENEY C, *et al*. **The PtdIns 3-kinase/Akt pathway regulates macrophage-mediated ADCC against B cell lymphoma.** *PLoS One*, 2009, 4(1), 4208.

JU T, CUMMINGS RD. **A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:16613-8.

JU T, LANNEAU GS, GAUTAM T. *et al*. **Human tumor antigen Tn and sialyl-Tn arise from mutations in Cosmc**, *Cancer Res,* 2008, 68 (6), 1636-46.

JU T, OTTO VI, CUMMINGS RD. **The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity.** *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(8):1770-91.

JUNE CH. **Principles of adoptive T cell cancer therapy.** *J Clin Invest,* 2007, 117(5), 1204-12.

KAMEOKA D, MASUZAKI E, UEDA T, *et al.* **Effect of buffer species on the unfolding and the aggregation of humanized IgG.** *J Biochem*, 2007, 142(3), 383-91.

KANTOFF PW, HIGANO CS, SHORE ND, *et al.* **Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer.** *N Engl J Med,* 2010, 363(5), 411-22.

KAWAGUCHI T, TAKAZAWA H, IMAI S, *et al.* **Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?** *Breast Cancer Res Treat,* 2006, 98(1):31-43.

KHAMMARI A, LABARRIÈRE N, VIGNARD V, *et al.* **Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones.** *J Invest Dermatol,* 2009, 129(12), 2835-42.

KING MJ, PARSONS SF, WU AM, *et al.* **Immunochemical studies on the differential binding properties of two monoclonal antibodies reacting with Tn red cells.** *Transfusion,* 1991, 31(2):142-9.

KREITMAN RJ, PASTAN I. **Antibody fusion proteins: anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox.** *Clin Cancer Res*, 2011, 17(20), 6398-405.

KUMAR SR, SAUTER ER, QUINN TP, *et al*. **Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection.** *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19):6868-71.

KUNZ H. **Synthetic glycopeptides for the development of tumour-selective vaccines.** *J Pept Sci,* 2003, 9(9), 563-73.

LAWRIE CH, MARAFIOTI T, HATTON CS, *et al.* **Cancer-associated carbohydrate identification in Hodgkin's lymphoma by carbohydrate array profiling.** *Int J Cancer,* 2006, 118(12):3161-6.

LEATHEM AJ, BROOKS SA. **Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival.** *Lancet*, 1987, 1(8541), 1054-6.

LEE JW, HAN HD, SHAHZAD MM, *et al.* **EphA2 immunoconjugate as molecularly targeted chemotherapy for ovarian carcinoma.** *J Natl Cancer Inst,* 2009, 101(17):1193-205.

LEPELLETIER Y, CAMARA-CLAYETTE V, JIN H. *et al*. **Prevention of Mantle lymphoma tumor establishment by routing transferring receptor toward lysosomal compartments**. *Cancer Res,* 2007, 67(3), 1145-54.

LESCAR J, SANCHEZ JF, AUDFRAY A, *et al.* **Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by Helix pomatia lectin.** *Glycobiology*, 2007, 17(10):1077-83.

LEWIS PHILLIPS GD, LI G, DUGGER DL, *et al.* **Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate.** *Cancer Res*, 2008, 68(22), 9280-90.

LI B, VANROEY M, WANG C, *et al.* **Anti-programmed death-1 synergizes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell immunotherapy providing therapeutic benefit to mice with established tumors.** *Clin Cancer Res*, 2009, 15(5), 1623-34.

LI H, SUN H, QIAN Z-M. **The role of transferrin-transferrin-receptor system in drug delivery and targeting.** *Trends Pharmacol. Sci,* 2002, 23(5), 106-209.

LI Q, ANVER MR, BUTCHER DO, *et al.* **Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines.** *Mol Cancer Ther*, 2009, 8:971-9.

LI Y, YU W.H, REN J. *et al*. **Heregulin targets γ-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein.** *Mol. Cancer Res,* 2003, 1, 765-75.

LIM SH, VAUGHAN AT, ASHTON-KEY M, *et al.* **Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy.** *Blood*, 2011, 118(9):2530-40.

LO-MAN R, BAY S, VICHIER-GUERRE S. *et al*. **A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy**. *Cancer Res,* 1999, 59, 1520-24.

LO-MAN R, VICHIER-GUERRE S, BAY S. *et al*. **Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptides displaying a tri-Tn glycotype.** *J. Immunol,* 2001, 166, 2849-54.

LO-MAN R, VICHIER-GUERRE S, PERRAULT R. *et al*. **A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates.** *Cancer Res,* 2004, 64, 4987-94.

LONGENECKER BM, WILLANS DJ, MACLEAN GD, *et al.* **Monoclonal antibodies and synthetic tumor-associated glycoconjugates in the study of the expression of Thomsen-Friedenreich-like and Tn-like antigens on human cancers.** *J Natl Cancer Inst,* 1987, 78(3), 489-96.

LUTSIAK ME, SEMNANI RT, DE PASCALIS R, *et al.* **Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide.** *Blood,* 2005, 105: 2862-8.

MANCARDI DA, ALBANESI M, JÖNSSON F, *et al*. **The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy.** *Blood*, 2013, 121(9):1563-73.

MATSUKITA S, NOMOTO M, KITAJIMA S, *et al.* **Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma.** *Histopathology*, 2003, 42(1):26-36.

MATTES MJ, SHARKEY RM, KARACAY H, *et al.* **Therapy of advanced B-lymphoma xenografts with a combination of 90Y-anti-CD22 IgG (epratuzumab) and unlabeled anti-CD20 IgG (veltuzumab).** *Clin Cancer Res*, 2008, 14(19), 6154-60.

MAXFIELD F.R, MCGRAW T.E. **Endocytic recycling.** *Nature Rev. Mol. cell Biol,* 2004, 5(2), 121-132.

MAZAL D, LO-MAN R, BAY S, *et al.* **Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immuno-targeting of cancer.** *Cancer Immunol Immunother,* 2013, 62(6):1107-22.

MEMPEL TR, PITTET MJ, KHAZAIE K, *et al.* **Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation.** *Immunity,* 2006, 25(1), 129-41.

MERLIN JL, BARBERI-HEYOB M, BACHMANN N. **In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin) combined with paclitaxel (Taxol) or docetaxel (Taxotere) in HER2-expressing human breast cancer cell lines.** *Ann Oncol*, 2002, 13(11):1743-8.

MINARD-COLIN V, XIU Y, POE JC, *et al.* **Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcgammaRI, FcgammaRIII, and FcgammaRIV.** *Blood*, 2008, 112(4), 1205-13.
MORITA N, YAJIMA Y, ASANUMA H, *et al*. **Inhibition of cancer cell growth by anti-Tn monoclonal antibody MLS128.** *Biosci Trends*, 2009, 3(1), 32-7.

MOUTEL S. **Sélection et amélioration d'anticorps recombinants, applications à la recherche fondamentale et à l'immunothérapie.** Thèse de Doctorat. Paris : Université Pierre et Marie Curie, 2009.

MUSOLINO A, NALDI N, BORTESI B. *et al*. **Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacity of Trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer.** *J. Clin. Oncol*, 2008, 26(11), 1-9.

NAKADA H, NUMATA Y, INOUE M, *et al.* **Elucidation of an essential structure recognized by an anti-GalNAc alpha-Ser(Thr) monoclonal antibody (MLS 128).** *J Biol Chem*, 1991, 266(19):12402-5.

NAKADA H, INOUE M, NUMATA Y, *et al.* **Epitopic structure of Tn glycophorin A for an anti-Tn antibody (MLS 128).** *Proc Natl Acad Sci USA,* 1993, 90:2495-9.

NAPOLETANO C, RUGHETTI A, AGERVIG TARPS M.P. *et al.* **Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells.** *Cancer Res,* 2007, 67(17), 8358-67.

NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. **Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding.** *Science*, 2005, 310(5753), 1510-2.

NIMMERJAHN F, RAVETCH JV. **Fcgamma receptors as regulators of immune responses.** *Nat Rev Immunol,* 2008, 8(1), 34-47.

NUMATA Y, NAKADA H, FUKUI S, *et al.* **A monoclonal antibody directed to Tn antigen.** *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 170(3), 981-5.

O'BOYLE KP, COATSWORTH S, ANTHONY G, *et al.* **Effects of desialylation of ovine submaxillary gland mucin (OSM) on humoral and cellular immune responses to Tn and sialylated Tn.** *Cancer Immun.* 2006 Mar 9;6:5.

O'BRIEN SG, GUILHOT F, LARSON RA, *et al.* **Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, 2003, 348(11), 994-1004.

OFLAZOGLU E, STONE IJ, GORDON K, *et al.* **Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker.** *Clin Cancer Res,* 2008, 14(19):6171-80.

OLD LJ, BOYSE EA. **Immunology of experimental tumors.** *Annu Rev Med.* 1964, 15:167-86.

OPPEZZO P, OSINAGA E, TELLO D. *et al*. **Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen.** *Hybridoma,* 2000, 19(3), 229-39.

ORANGE JS. **Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse.** *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9), 713-25.

OSINAGA E, PANCINO G, BEUZELIN M, *et al.* **Detection of a soluble antigen defined by monoclonal antibody 83D4 in serous effusions associated with breast carcinoma.** *Cancer*, 1992, 69(7), 1745-9.

OSINAGA E, PANCINO G, PORCHET N, *et al.* **Analysis of a heterogeneous group of human breast carcinoma associated glycoproteins bearing the Tn determinant.** *Breast Cancer Res Treat*, 1994, 32(2), 139-52.

OSINAGA E, BAY S, TELLO D, *et al.* **Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectrospcopy.** *FEBS Letters,* 2000, 469:24-8.

PANCINO GF, OSINAGA E, VORAUHER W, *et al.* **Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method.** *Hybridoma*, 1990, 9(4):389-95.

PANCINO G, OSINAGA E, CHARPIN C, *et al.* **Purification and characterisation of a breast-cancer-associated glycoprotein not expressed in normal breast and identified by monoclonal antibody 83D4.** *Br J Cancer,* 1991, 63(3): 390–398.

PARDOLL DM. **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** Nat Rev Cancer, 2012, 12(4):252-64.

PARK S, JIANG Z, MORTENSON ED, *et al.* **The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity.** *Cancer Cell,* 2010, 18(2), 160-70.

PASTAN I, HASSAN R, FITZGERALD DJ, *et al.* **Immunotoxin therapy of cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):559-65.

PEGRAM MD, KONECNY GE, O'CALLAGHAN C, *et al.* **Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer.** *J Natl Cancer Inst,* 2004, 96(10):739-49.

PERERA RM, ZONCU R, JOHNS TG, *et al.* **Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody.** *Neoplasia,* 2007, 9(12):1099-110.

PIETERSZ GA, WENJUN L, KRAUER K, *et al.* **Comparison of the biological properties of two anti-mucin-1 antibodies prepared for imaging and therapy.** *Cancer Immunol Immunother,* 1997, 44(6):323-8.

PILLER F, PILLER V, FOX RI, *et al.* **Human T-lymphocyte activation is associated with changes in *O*-glycan biosynthesis.** *J. Biol. Chem,* 1988, 263(29), 15146-50.

POLITO L, BORTOLOTTI M, PEDRAZZI M, *et al*. **Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy.** *Toxins* (Basel), 2011, 3(6), 697-720.

PROBST A, CARTRON G, WATIER H. **Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux recombinants utilisés en oncologie.** *Bull. Cancer,* 2006, hors série, 107-12.

PROIETTI E, GRECO G, GARRONE B, *et al*. **Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice**. *J Clin Invest,* 1998, 101(2):429-41.

QUEZADA SA, PEGGS KS. **Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer.** *Br J Cancer*, 2013.

REIS CA, DAVID L, SEIXAS M, *et al.* **Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma.** *Int J Cancer,* 1998, 79(4):402-10.

ROSENBERG SA, RESTIFO NP, YANG JC, *et al.* **Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy.** *Nat Rev Cancer,* 2008, 8(4), 299-308.

RUDNICK SI, LOU J, SHALLER CC, *et al.* **Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors.** *Cancer Res*, 2011, 71(6):2250-9.

RYAN MC, KOSTNER H, GORDON KA, *et al.* **Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75**. *Br J Cancer,* 2010, 103(5):676-84.

SAMIM M, PRASHANT CK, DINDA AK, *et al.* **Synthesis and characterization of gold nanorods and their application for photothermal cell damage.** *Int J Nanomedicine*, 2011, 6, 1825-31.

SANDERSON RJ, HERING MA, JAMES SF, *et al.* **In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate.** *Clin Cancer Res*, 2005, 11, 843-52.

SAPRA P, SHOR B. **Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges.** *Pharmacol Ther,* 2013, S0163-7258(13)00073-9.

SCHIETINGER A, PHILIP M, YOSHIDA BA, *et al.* **A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen.** *Science,* 2006, 314:304-8.

SCHREIBER RD, OLD LJ, SMYTH MJ. **Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.** *Science*, 2011, 331(6024):1565-70.

SHEFF DR, DARO EA, HULL M. *et al.* **The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions.** *J. Cell Biol,* 1999, 145(1), 123-39.

SINGH SK, STRENG-OUWEHAND I, LITJENS M, *et al.* **Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties.** *Mol Immunol*, 2009, 46(6):1240-9.

SINGHAL A, FOHN M, HAKOMORI S. **Induction of alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice.** *Cancer Res,* 1991, 51(5), 1406-11.

SLOVIN SF, RAGUPATHI G, MUSSELLI C, *et al*. **Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine.** *J Clin Oncol*, 2003, 21(23):4292-8.

SLOVIN SF, RAGUPATHI G, MUSSELLI C, *et al.* **Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer.** *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(7):694-702.

SMITH KG, CLATWORTHY MR. **FcgammaRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications.** *Nat Rev Immunol,* 2010, 10(5), 328-43.

SMITH LM, NESTEROVA A, RYAN MC, *et al.* **CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers.** *Br J Cancer,* 2008, 99(1):100-9.

SMITH MR. **Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance.** *Oncogene*, 2003, 22(47), 7359-68.

SORKIN A, VON ZASTROW M. **Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8):600-14.

SPRINGER GF. **T and Tn, general carcinoma autoantigens.** *Science*, 1984, 224(4654), 1198-206.

SPRINGER GF. **T and Tn pancarcinoma markers: autoantigenic adhesion molecules in pathogenesis, prebiopsy carcinoma-detection, and long-term breast carcinoma immunotherapy.** *Crit. Rev. Oncog,* 1995, 6(1), 57-85.

SPRINGER GF. **Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy.** *J Mol Med* (Berl), 1997, 75(8):594-602.

SRIVASTAVA PK, CALLAHAN MK, MAURI MM. **Treating human cancers with heat shock protein-peptide complexes: the road ahead.** *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(2), 179-86.

STIRPE F, BARBIERI L, BATTELLI MG, *et al*. **Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects**. *Biotechnology (N Y)*, 1992, 10(4):405-12.

STUTMAN O. **Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice.** *Science*, 1974, 183(4124):534-6.

STUTMAN O. **Immunodepression and malignancy.** *Adv Cancer Res*, 1975, 22:261-422.

TAIEB J, CHAPUT N, SCHARTZ N, *et al.* **Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines.** *J Immunol,* 2006, 176(5):2722-9.

TAKAHASHI HK, METOKI R, HAKOMORI S. **Immunoglobulin G3 monoclonal antibody directed to Tn antigen (tumor-associated alpha-N-acetylgalactosaminyl epitope) that does not cross-react with blood group A antigen.** *Cancer Res,* 1988, 48(15):4361-7.

TARHINI AA, KIRKWOOD JM. **Clinical and immunologic basis of interferon therapy in melanoma.** *Ann N Y Acad Sci,* 2009, 1182, 47-57.

TEICHER BA. **Antibody-drug conjugate targets**. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(8):982-1004.

TEMMING K, MEYER DL, ZABINSKI R, *et al.* **Improved efficacy of alphavbeta3-targeted albumin conjugates by conjugation of a novel auristatin derivative.** *Mol Pharm,* 2007, 4(5), 686-94.

TERASAWA K, FURUMOTO H, KAMADA M, *et al.* **Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells.** *Cancer Res,* 1996, 56(9):2229-32.

THINGSTAD T, VOS H.L, HILKENS J. **Biosynthesis and shedding of epiglycanin: a mucin-type glycoprotein of the mouse $TA_3$Ha mammary carcinoma cell.** *Biochem. J,* 2001, 353, 33-40.

THOMAS L. **Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states.** *H. Lawrence, Ed.* (Hoeber-Harper, New York, 1959).

THOMAS L. **On immunosurveillance in human cancer.** *Yale J Biol Med,* 1982, 55:329-33.

TOPALIAN SL, DRAKE CG, PARDOLL DM. **Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.** *Curr Opin Immunol,* 2012, 24(2):207-12.

TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, *et al.* **Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.** *N Engl J Med,* 2012, 366(26):2443-54.

TORRES DEMICHELIS V, VILCAES AA, IGLESIAS-BARTOLOME R, *et al.* **Targeted delivery of immunotoxin by antibody to ganglioside GD3: a novel drug delivery route for tumor cells.** *PLoS One,* 2013, 8(1):e55304.

UCHIDA J, HAMAGUCHI Y, OLIVER JA, *et al.* **The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy.** *J Exp Med*, 2004, 199(12), 1659-69.

ULBRICH K, SUBR V. **Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation.** *Adv Drug Deliv Rev,* 2004, 56(7):1023-50.

VACCHELLI E, EGGERMONT A, GALON J, *et al.* **Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy.** *Oncoimmunology,* 2013, 2(1):e22789.

VAN DEN EYNDE BJ, VAN DER BRUGGEN P. **T cell defined tumor antigen.** *Curr. Opin. Immunol,* 1997, 9(5), 684-93.

VAN DER GOOT FG, GRUENBERG J. **Intra-endosomal membrane traffic.** *Trends Cell Biol*, 2006, 16(10):514-21.

VAN DER MOST RG, CURRIE AJ, CLEAVER AL, *et al.* **Cyclophosphamide chemotherapy sensitizes tumor cells to TRAIL-dependent CD8 T cell-mediated immune attack resulting in suppression of tumor growth.** *PLoS One,* 2009, 4(9):e6982.

VAN SPRIEL AB, LEUSEN JH, VAN EGMOND M, *et al.* **Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation.** *Blood*, 2001, 97(8), 2478-86.

VIAUD S, THÉRY C, PLOIX S, *et al.* **Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?** *Cancer Res*, 2010, 70(4):1281-5.

VINCENZI B, SCHIAVON G, SILLETTA M, et al. **The biological properties of cetuximab.** *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 68(2), 93-106.

VON MEHREN M, ADAMS GP, WEINER LM. **Monoclonal antibody therapy for cancer.** *Annu Rev Med,* 2003, 54, 343-69.

WELINDER C, BALDETORP B, BORREBAECK C, *et al.* **A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with in vivo anti-tumor activity.** *Glycobiology,* 2011, 21(8), 1097-107.

WIDERA A, NOROUZIYAN F, SHEN WC. **Mechanisms of TfR-mediated transcytosis and sorting in epithelial cells and applications toward drug delivery.** *Adv. Drug Deliv. Rev,* 2003, 55(11), 1439-66.

WOLPOE ME, LUTZ ER, ERCOLINI AM, *et al.* **HER-2/neu-specific monoclonal antibodies collaborate with HER-2/neu-targeted granulocyte macrophage colony-stimulating factor secreting whole cell vaccination to augment CD8+ T cell effector function and tumor-free survival in Her-2/neu-transgenic mice.** *J Immunol,* 2003, 171(4), 2161-9.

WU AM, SENTER PD. **Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates.** *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9):1137-46.

XUAN C, STEWARD KK, TIMMERMAN JM, *et al.* **Targeted delivery of interferon-alpha via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma.** *Blood,* 2010, 115(14), 2864-71.

YANG LH, TSENG HS, LIN C, *et al.* **Survival benefit of tamoxifen in estrogen receptor-negative and progesterone receptor-positive low grade breast cancer patients.** *J Breast Cancer*, 2012, 15(3), 288-95.

YU LG. **The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression.** *Glycoconj J,* 2007, 24(8):411-20.

ZHANG S, ZHANG HS, REUTER VE, *et al.* **Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers.** *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2):295-302.

ZITVOGEL L, KEPP O, KROEMER G. **Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens.** *Nat Rev Clin Oncol,* 2011, 8(3):151-60.