Développement d'un vecteur bactérien pour l'immunothérapie anti-tumorale active et spécifique et caractérisation de la réponse immune induite

Xavier Chauchet

▶ **To cite this version:**

Xavier Chauchet. Développement d'un vecteur bactérien pour l'immunothérapie anti-tumorale active et spécifique et caractérisation de la réponse immune induite. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENS024 . tel-01559128

HAL Id: tel-01559128

https://theses.hal.science/tel-01559128

Submitted on 10 Jul 2017

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement.

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Xavier CHAUCHET

Thèse dirigée par **Mr. le Professeur Bertrand TOUSSAINT**

Préparée au sein du Laboratoire **« Thérapeutique Recombinante Expérimentale (TheREx) » TIMC-IMAG, UMR CNRS 5525.**

École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE)

DÉVELOPPEMENT D'UN VECTEUR BACTÉRIEN POUR L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE ACTIVE ET SPÉCIFIQUE ET CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE IMMUNE INDUITE

Thèse soutenue publiquement le **1er Octobre 2014,**
devant le jury composé de :

Mr le Professeur Benoît POLACK Université Joseph Fourier, CHU Grenoble	**Président**
Mme le Professeur Claude LECLERC Institut Pasteur (Inserm U1041), Paris	**Rapporteur**
Mr le Docteur Pascal SIRAND-PUGNET Université de Bordeaux	**Rapporteur**
Mme le Docteur Jacqueline MARVEL Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon	**Examinateur**
Mr le Docteur Laurent BUFFAT Société APCure SAS	**Examinateur**
Mme le Docteur Audrey LE GOUELLEC Université Joseph Fourier, CHU Grenoble	**Examinateur**
Mr le Docteur Jean BOUTONNAT Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble	**Invité**
Mr le Professeur Bertrand TOUSSAINT Université Joseph Fourier, CHU Grenoble	**Directeur de thèse**

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

TABLE DES MATIÈRES

TABLES DES ILLUSTRATIONS **5**
PROBLÉMATIQUE **11**
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **14**
A.ACTIVATION ET RÉGULATION DE L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE ANTI-TUMORALE 15
I. La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immunitaire 17
1. Origine et fonctions des cellules dendritiques 17
2. Le signal de danger entraîne la maturation des cellules dendritiques et facilite leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires 19
3. Interaction CD - Lymphocytes T naïfs 21
II. Orientation de la réponse T et régulation 24
1. Polarisation des lymphocytes T CD4+ 24
2. Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTLs) 27
3. Régulation des lymphocytes T activés (immunomodulation) 28
III. La réponse T CD8+ mémoire 29
1. La contraction clonale 29
2. Différentiation en cellules mémoires 30
3. Propriétés des cellules mémoires 31
4. Sous-types de cellules mémoires 32
5. Rôle des T CD4+ helper dans la réponse T CD8+ mémoire 33
6. Importance de la réponse mémoire dans l'immunité anti-tumorale 33
IV. Quelle(s) réponse(s) T pour une immunité anti-tumorale ? 35
V. Induction d'une immunité anti-tumorale : un défi multi-étapes ? 36
B.UN MESSAGE ANTIGÉNIQUE POUR L'IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE 38
I. Antigènes multiples, non définis 38
II. Antigènes définis 38
1. Les antigènes associés aux tumeurs, retrouvés de manière prédominante dans la tumeur ou surexprimés par rapport aux tissus sains 39
2. Les antigènes exprimés uniquement par la tumeur 40
III. La quête du « bon message antigénique » 41
C.STRATÉGIES D'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE ACTIVE SPECIFIQUE 45
I. Antigènes tumoraux non vectorisés 45
II. Cellules dendritiques chargées en antigènes *ex vivo* puis réinjectées 46
III. Utilisation de vecteurs 47
1. Vecteurs plasmidiques (ADN nu) 47
2. Vecteurs protéiques 48
3. Liposomes 48
4. Vecteurs viraux 49
5. Vecteurs bactériens 49
D.IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE SPÉCIFIQUE ET *Pseudomonas aeruginosa* 54
I. *P. aeruginosa* : un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales……..54
II. Système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* : structure, fonction et régulation.. 54
1. Structure du SST3 de *P. aeruginosa* 54
2. Régulation du SST3 de *P. aeruginosa* 56
3. Fonction du SST3 de *P. aeruginosa* 58
III. *P. aeruginosa* comme vecteur de protéines d'intérêt thérapeutique 58

1. Historique 58
2. Asservissement du SST3 de *P. aeruginosa* 59
3. Détoxification de la souche bactérienne 60
4. Applications : vectorisation de protéines pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique ou pour la thérapie cellulaire 61
5. Optimisation de la souche vaccinale pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique 63
IV. Sécurisation de la souche vaccinale 64
1. Quels sont les besoins en termes d'atténuation ? 64
2. Le concept des bactéries « *Killed But Metabolically Active* » 65
E.L'ANHYDRASE CARBONIQUE 9 : ANTIGENE D'INTERET POUR L'IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS ? 68
I. L'Anhydrase carbonique 9 : structure, localisation cellulaire et tissulaire 68
II. Régulation de l'expression et de l'activité de l'AC9 70
III. Rôle de l'AC9 71
1. Tissu sain 71
2. Tissu tumoral 72
IV. L'AC9 cible thérapeutique 74
1. Inhibiteurs 75
2. Immunothérapie passive 76
3. Immunothérapie active 78
RESULTATS 84
PARTIE I : Développement d'un vecteur KBMA *P. aeruginosa* 85
A.OBJECTIFS ET CONTRIBUTION AUX TRAVAUX 86
B.MATERIEL ET METHODES 87
C.RESULTATS 91
D.DISCUSSION 93
PARTIE II : Etude de la réponse immune anti-tumorale induite 109
PARTIE III : Application à l'antigène anhydrase carbonique 9 138
A.INTRODUCTION 139
B.MATERIELS ET METHODES 140
C.RESULTATS 148
DISCUSSION et PERSPECTIVES 159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 170
ANNEXES 190

TABLES DES ILLUSTRATIONS

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Segmentation des domaines de l'immunothérapie..... 12
Figure 2 : Concept de l'immuno-édition du cancer (*Cancer Immunoediting*)(Schreiber et al., 2011).. 16
Figure 3 : Les cellules dendritiques immatures induisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de l'antigène (Banchereau and Palucka, 2005b) 18
Figure 4 : Voies intracellulaires de présentation croisée. (Joffre et al., 2012) 22
Figure 5 : Les cellules dendritiques matures induisent l'immunité (Banchereau and Palucka, 2005b) 23
Figure 6 : Différentiation des lymphocytes T CD4+ (O'Shea and Paul, 2010). 26
Figure 7 : Mécanismes simplifiés de stimulation et d'inhibition des lymphocytes T et thérapies ciblant ces voies (adapté de Sharma *et al.* 2011) 28
Figure 8 : Illustration graphique des cinétiques d'expension des lymphocytes T CD8+ naïfs à la suite d'une infection chez la souris par un pathogène virulent de type *Listeria monocytogenes*, LCMV, VSV ou le virus de la Vaccine. D'après (Williams and Bevan, 2007)..... 30
Figure 9 : Le soutien des LT CD4+ helper est requis pour l'obtention d'une réponse T CD8+ mémoire protectrice (Kaech and Ahmed, 2003)..... 33
Figure 10 : Changement fonctionnels et phénotypique des LT CD8+ induits par une stimulation chronique par l'antigène.(Klebanoff et al., 2006) 34
Figure 11: Forces immunostimulantes et immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral. (Finn, 2008)..... 37
Figure 12 : Hiérarchisation des antigènes de tumeurs effectuée à partir des critères prédéfinis par les experts (Cheever et al., 2009)..... 43
Figure 13 : Classification des antigènes de tumeurs après exclusion des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité (Cheever et al., 2009). 44
Figure 14 : Approche vaccinale basée sur l'éducation *ex vivo* des cellules dendritiques puis la réinjection afin d'induire l'immunité anti-tumorale (Tacken et al., 2007)..... 46
Figure 15 : Méthodes de délivrance intracellulaire d'antigènes par différents vecteurs bactériens génétiquement modifiés. (Toussaint et al., 2013)..... 53
Figure 16 : Structure du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. 55
Figure 17 : Schéma de la régulation du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa.* (Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint, 2012) 57
Figure 18 : Plasmide pEAI3 S54 (GenBank: JQ733380.1). (Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint, 2012) 60
Figure 19 : Concept de l'immunothérapie anti-tumorale spécifique utilisant le SST3 de *P. aeruginosa* 62
Figure 20 : Principe du traitement photochimique (d'après Cerus Corporation. www.cerus.com) 66

Figure 21 : Structure de l'anhydrase carbonique 9. 68
Figure 22 : Immunomarquage de l'anhydrase carbonique 9 d'un tissu rénal sain (A) et d'un tissu d'adénocarcinome rénal à cellules claires (B). (Ivanov et al., 2001). 69
Figure 23 : L'expression de l'anhydrase carbonique 9 est liée indirectement à la protéine Von-Hippel-Lindau (pVHL). (Stillebroer et al., 2010)..... 71
Figure 24 : L'inhibition de l'activité de l'AC9 diminue la survie et l'invasion des cellules tumorales. (McDonald et al., 2012). 73
Figure 25 : Plasmide de mutagenèse pEX100Tlink. 87
Figure 26 : Mutagenèse par échange allélique et élimination du marqueur de sélection. 90
Figure 27 : Analyse génotypique du mutant CHA-OST*ΔuvrA* en comparaison avec la souche sauvage. 92
Figure 28 : Principe du test ELISpot. 147
Figure 29 : Schéma de la séquence protéique de l'anhydrase carbonique 9 humaine (base de données Swiss-prot Q16790) et des protéines de fusion. 149
Figure 30 : Etude de la sécrétion de protéines de fusion ExoS54-fragment de l'AC9 humaine par le SST3 dans les surnageants de culture bactérienne. 150
Figure 31 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'anhydrase carbonique 9 humaine suite à la transfection de la lignée Renca par le plasmide pcDNA3.1 hAC9. 152
Figure 32 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'anhydrase carbonique 9 humaine par la lignée de mélanome B16. 153
Figure 33 : Caractérisation de l'expression de l'hAC9 par la lignée clonale B16 hAC9. 154
Figure 34 : Schéma d'immunisation pour la réalisation de l'ELISpot sur splénocytes de souris balb/c immunisées par différentes souches candidates 155
Figure 35 : Schéma d'immunisation pour la réalisation de l'ELISpot sur splénocytes de souris C57BL/6 immunisées par différentes souches candidates 155
Figure 36 : Challenge tumoral n°1 en schéma d'immunisation prophylactique 156
Figure 37 : Etude de survie après challenge tumoral avec le modèle de mélanome murin B16 hAC9157
Figure 38 : Challenge tumoral n°2 en schéma d'immunisation prophylactique 157
Figure 39 : Etude de survie après challenge tumoral n°2 avec le modèle de mélanome murin B16 hAC9. 158

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Importance relative des critères majeurs définissant un antigène de tumeur idéal (Cheever et al., 2009)..... 41

Tableau 2 : Immunothérapies anti-tumorales active et spécifiques par vecteurs bactériens atténués en études cliniques (recueil effectué à partir de la base de données d'essais cliniques du *National Institute of Health ; clinicaltrial.gov*)..... 51
Tableau 3 : Inactivation des bactéries par Intercept Blood System®. Traitement photochimique appliqué: 150µM de psoralène S-59 et 3J/cm² d'UVA. 66
Tableau 4 : Etudes cliniques d'immunothérapie anti-tumorale active achevées ou en cours, dirigée contre l'anhydrase carbonique IX. (clinicaltrial.gov)..... 80
Tableau 5 : Amorces pour l'amplification des séquences utilisées pour la délétion des gènes *uvrA* et *uvrB* et pour la vérification des mutants obtenus. 88
Tableau 6 : Amorces et sites de restriction enzymatique utilisés pour l'amplification et le clonage de différentes séquences codant des fragments de l'AC9 humaine dans le plasmide PEAI S54. 140
Tableau 7 : Epitopes murins ou humains T CD8+, prédits ou décrits dans la littérature, présents dans différentes protéines antigéniques (AC9 humaine tronquée) utilisées pour cette etude. 141

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARN : Acide Ribonucléique
ASI : *Active Specific Immunotherapy*
BMDC : *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (cellules dendritiques dérivées de la moëlle osseuse)
Cb : Carbenicilline
CCL3 : Chimiokine (motif C-C) ligand 3 aussi appelée MIP-1α (*Macrophage inflammatory protein- 1α*)
CCL4 : Chimiokine (motif C-C) ligand 4 aussi appelée MIP-1β (*Macrophage inflammatory protein- 1β*)
CCL5 : Chimiokine (motif C-C) ligand 5 aussi appelé RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)
CD : Cellule Dendritique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPAg : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPRG : Chlorophenolred-β-D-Galactopyranoside
CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte* (lymphocyte T cytotoxique)
CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique)
DO : Densité Optique
EDTA : Ethylène Diamine Tétraacétate
ELISpot: *Enzyme-Linked ImmunoSpot*
EMEA : *European Medicines Agency*
FDA : US *Food and Drug Administration*
Gm : Gentamicine
GM-CSF: *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (cytokine immunostimulante)
$H2K^b$: complexe majeur d'histocompatibilité de classe I de la souris C57BL/6
IFN : Interferon
IL : Interleukine
IPTG : Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
KBMA : *Killed But Metabolically Active* (tué mais métaboliquement actif)
kDa : kiloDalton
LB : milieu de culture Luria & Bertani
LDH : Lactate Deshydrogénase
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
MOI : *Multiplicity Of Infection* (nombre de bactérie(s) par cellule eucaryote)
O/D : *Overday* (sur la journée)
O/N : *Overnight* (sur la nuit)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pb : paires de bases
PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*
PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction d'amplification en chaîne)
PCT : *Photochemical Treatment* (traitement photochimique)
PD1 : *Programmed cell Death protein 1*
PD-L1 : *Programmed cell Death Ligand 1*
PIA : *Pseudomonas Isolation Agar*
PRR : *Pattern recognition receptor*
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : SDS *polyacrylamide gel electrophoresis*
SST3 : Système de Sécrétion de Type III
SVF : Sérum de Veau Fœtal
Tc : Tétracycline
TCA : Acide Trichloracétique
TCR : *T cell receptor*, récepteur des cellules T
TLR : *Toll-Like Receptor* (récepteurs de la famille Toll)
TNF : *Tumor Necrosis Factor* (facteur de nécrose tumorale)
XCL1 : Chimiokine (motif C) ligand 1
$\mathbf{X^r}$: résistance à l'antibiotique X
$\mathbf{X^s}$: sensible à l'antibiotique X

PROBLÉMATIQUE

Malgré la mise en place du dépistage, l'amélioration des techniques diagnostiques et le développement de thérapies innovantes, les cancers demeurent une cause majeure de mortalité dans le monde. Les derniers chiffres publiés par l'OMS montrent que les décès par cancer sont supérieurs à ceux du SIDA, de la tuberculose et du paludisme réunis. Pour l'année 2012, 8,2 millions de décès ont été relevés (soit 13% de la mortalité mondiale) et, d'après les projections publiées dans la base de données Globocan 2008, plus de 13 millions de personnes décèderont d'un cancer en 2030 (Jemal et al., 2011).

Les stratégies conventionnelles de traitement (chirurgie, chimiothérapie, hormonothérapie et radiothérapie) restent les piliers de la prise en charge thérapeutique; la chirurgie est d'ailleurs dans beaucoup de cas le seul et unique traitement curatif, mais nécessite une intervention à un stade précoce du développement tumoral.

L'évolution de nos connaissances sur la biologie des cancers (Hanahan and Weinberg, 2011), et l'essor des biotechnologies de la santé, ont rendu possible le développement des thérapies ciblées (anticorps monoclonaux et inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase), en particulier l'immunothérapie anti-tumorale (Kirkwood et al., 2012). Cette dernière consiste à moduler le système immunitaire, ou utiliser ses éléments, pour induire, amplifier ou restaurer une réponse anti-tumorale. Il s'agit actuellement d'une des approches les plus prometteuses pour le traitement du cancer, suscitant le très fort intérêt de la communauté médicale, et qui a été élue l'année dernière « *Breakthrough of the year* » par la revue *Science* (Couzin-Frankel, 2013). Certains analystes prédisent que dans les 10 prochaines années l'immunothérapie anti-tumorale constituera 60% des traitements des cancers avancés et que ce marché approchera les 35 milliards de dollars de chiffre d'affaires (Ledford, 2014).

Dans ce champ, deux axes ont été développés : l'immunothérapie anti-tumorale *active*, qui mobilise ou renforce les ressources du système immunitaire (vaccins, cytokines), et l'immunothérapie anti-tumorale *passive*, qui apporte de manière exogène les effecteurs immunitaires humoraux ou cellulaires (Figure 1). L'immunothérapie anti-tumorale active peut être ensuite subdivisée en *approches spécifiques (Active Specific Immunotherapy, ASI)*, consistant à générer une réponse immune vis-à-vis d'antigènes exprimés par la tumeur - ou *non-spécifiques*, ayant pour but d'amplifier une réponse immune existante par l'administration d'immunomodulateurs.

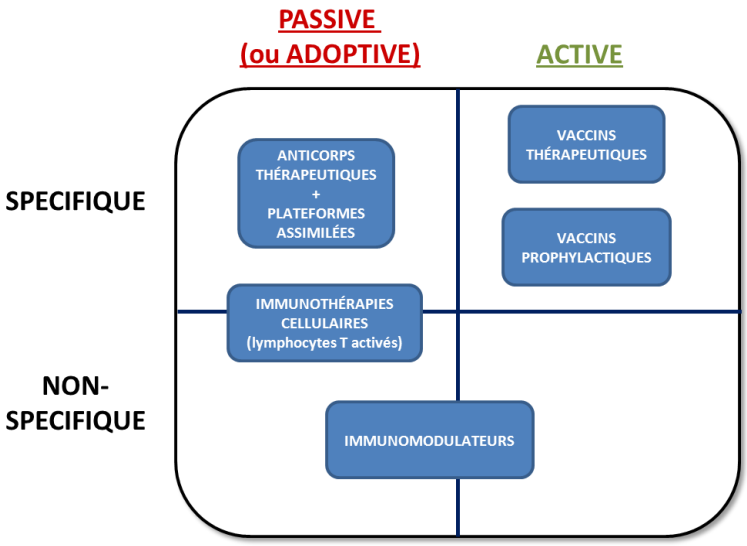


Figure 1 : Segmentation des domaines de l'immunothérapie (adaptée du rapport d'étude « Immunothérapie 2025 » des Entreprises du Médicaments (LEEM))

Le concept de vaccination thérapeutique contre la tumeur remonte aux travaux du chirurgien William B. Coley, à la fin du 19ème siècle, qui avait observé des régressions tumorales, et même des rémissions complètes, après inoculation de bouillons de bactéries mortes directement dans la tumeur (« Toxine de Coley » ou « Vaccin de Coley ») (Coley, 1910). Il a été depuis démontré que l'injection *in situ* de bactéries mortes entraine une forte réponse inflammatoire locale, propice au développement d'une réponse du système immunitaire contre la tumeur. On utilise encore aujourd'hui des instillations intravésicales du bacille de Calmette et Guérin (BCG) dans le traitement adjuvant post-chirurgical du cancer de la vessie non-invasif, protégeant ainsi environ 60% des patients d'une récidive (Brandau and Suttmann, 2007).

Les progrès réalisés en immunologie ont permis de mieux caractériser les éléments nécessaires à la génération d'une réponse immunitaire spécifique, efficace vis-à-vis de la tumeur : 1) présence d'un signal de danger adéquat pour produire une forte réponse immunitaire innée puis adaptative ; 2) choix pertinent d'antigènes associés à ou spécifiques de la tumeur (message antigénique) ; 3) délivrance des antigènes au système immunitaire de manière adaptée pour favoriser une réponse immune adaptative cellulaire.

C'est en partant de ce postulat que plusieurs stratégies d'immunothérapie anti-tumorale active spécifique dites *ex vivo* (injection de cellules dendritiques autologues activées et chargées par des antigènes tumoraux) ou *in vivo* (injection de lysats tumoraux autologues, vecteurs d'antigènes variés, etc…) ont été mises au point. De multiples études précliniques et cliniques ont été effectuées avec ces différentes approches et un premier vaccin thérapeutique

(sipuleucel-T, Provenge®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché de la FDA en 2010 pour le traitement du cancer de la prostate avancé, résistant à l'hormonothérapie. Malgré un bénéfice limité pour le patient (amélioration de la survie globale d'environ 4 mois) et un procédé de production complexe, cette preuve de concept ouvre clairement la voie au développement de nouvelles *ASI* (Cheever and Higano, 2011; Kantoff et al., 2010). Néanmoins les approches *in vivo* (basées sur l'utilisation de vecteurs), nettement plus simple à mettre en œuvre, semblent préférables.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. ACTIVATION ET RÉGULATION DE L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE ANTI-TUMORALE

***Il est clairement établi que le système immunitaire a la capacité d'éliminer des cellules néoplasiques*.** (Palucka and Banchereau, 2012)

Plusieurs observations confirment que le système immunitaire prévient le développement tumoral. Il a été constaté une augmentation de l'incidence des cancers chez l'humain et la souris en cas d'immunodéficience innée ou acquise, mais aussi un accroissement des cancers avec l'âge, lié à l'immunosénescence (Dighe et al., 1994; Euvrard et al., 2003; Hakim et al., 2004). Les résultats d'une étude rétrospective de 2007 obtenus par Roithmaier *et al*. sont particulièrement éloquents : sur 905 patients transplantés cardiaques et/ou pulmonaires et traités par immunosuppresseurs entre 1989 et 2004, un total de 102 nouveaux cas de cancers avait été diagnostiqué. Ce taux d'incidence représentait un chiffre 7,1 fois supérieur à celui de la population globale (Roithmaier et al., 2007).
Mais peut-être que la preuve la plus convaincante d'une immunosurveillance de la tumeur est l'observation de syndromes neurologiques paranéoplasiques (SNP). Leur apparition est liée à l'expression d'antigènes onconeuraux par les cellules tumorales. En effet, il a été montré que les patients présentant ce type de syndromes développaient une forte réponse T CD8+ spécifique initialement dirigée contre la tumeur, mais conduisant de manière concomitante, à l'apparition d'une dégénérescence neuronale autoimmune (immunité croisée), à l'origine de graves désordres neurologiques. Dans près de 80 % des cas, les SNP précèdent la découverte du cancer de quelques mois à plusieurs années. La tumeur est alors souvent de très petite taille, à un stade limité de son extension (Albert and Darnell, 2004; Graus et al., 2004).

En fait, il semble que le système immunitaire soit en mesure de détruire la tumeur dans un premier temps mais qu'ensuite il favorise la progression tumorale en sélectionnant des variants cellulaires immunorésistants (*Cancer Immunoediting*) (Schreiber et al., 2011). Ce concept de l'immuno-édition du cancer proposé par Schreiber *et al.* se décline en trois phases. Pendant la *phase d'élimination*, l'immunité innée et adaptative interviennent conjointement pour détruire la tumeur en développement, bien avant qu'elle soit cliniquement détectable. Si le système immunitaire parvient à éliminer les cellules tumorales, alors le processus s'achève ici. Cependant, si un variant cellulaire rare n'est pas supprimé, une phase d'équilibre se met

en place, le système immunitaire étant alors capable d'entraver le développement tumoral. Il semble d'ailleurs que le rôle de l'immunité adaptative soit primordial pour maintenir la tumeur dans cet état de « dormance fonctionnelle ». Cette *phase d'équilibre* peut également aboutir à un contrôle de la tumeur sur le long terme. Néanmoins, la pression de sélection constante du système immunitaire et l'instabilité génétique des cellules tumorales favorisent un équilibre précaire pouvant conduire à l'immuno-édition de la tumeur. Cette *phase d'échappement* tumoral est liée à l'émergence de nouveaux variants cellulaires, soit non reconnus par le système immunitaire adaptatif (par perte d'expression d'antigènes ou par défaillance du processus de présentation des antigènes), soit insensibles aux mécanismes effecteurs du système immunitaire, ou enfin, par la création d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. La tumeur peut alors se développer et devenir cliniquement apparente (Figure 2).

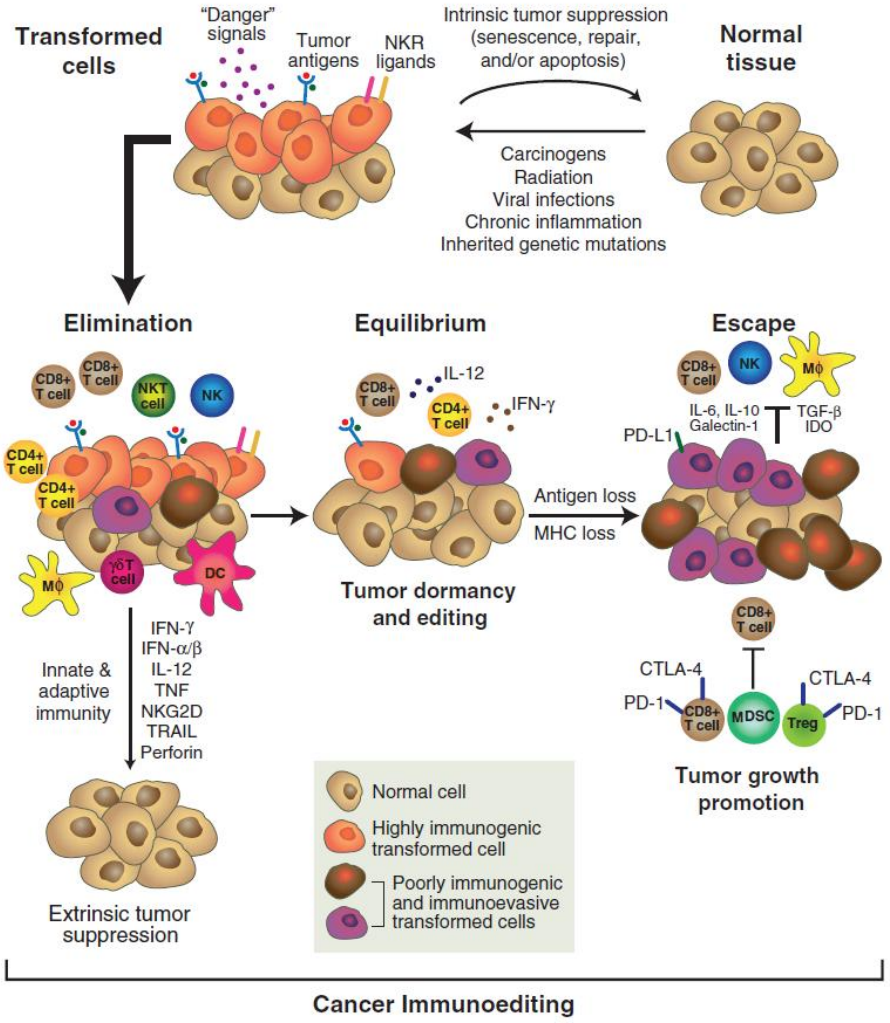


Figure 2: Concept de l'immuno-édition du cancer (*Cancer Immunoediting*) (Schreiber et al., 2011)

Les cellules tumorales sont connues pour être de piètres cellules présentatrices d'antigène, ce qui soulève la question de comment une réponse immune adaptative dirigée contre la tumeur peut elle être générée précocement. Des expériences *in vivo*, chez la souris, démontrent que la constitution d'une immunité anti-tumorale protectrice dépend surtout de la présentation des antigènes de tumeur par les cellules dendritiques (CD) (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011).

I. La cellule dendritique : chef d'orchestre de la réponse immunitaire

La mission du système immunitaire est de collecter des informations, les intégrer et déclencher ou non une réponse adaptée. Les cellules présentatrices d'antigènes, et particulièrement la cellule dendritique (CD), jouent un rôle central dans l'initiation et le contrôle de cette réponse. Les CD sont retrouvées dans la plupart des tumeurs chez la souris et l'humain et vont donc jouer ce rôle « d'échantillonnage » via la phagocytose de cellules tumorales mortes ou via leurs interactions avec les cellules vivantes (Dhodapkar et al., 2008).
Il paraît donc fondamental de comprendre la biologie des cellules dendritiques et la manière dont elles régulent l'immunité innée et adaptative, spécialement dans le contexte de l'immunité anti-tumorale (Banchereau and Palucka, 2005a; Steinman and Banchereau, 2007).

1. Origine et fonctions des cellules dendritiques (Liu and Nussenzweig, 2010)

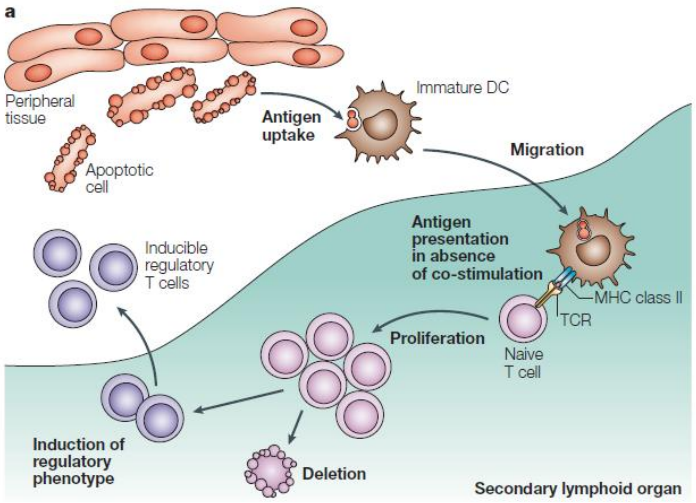
Les CD sont des cellules dérivées de la moelle osseuse que l'on retrouve dans tous les tissus périphériques ainsi que dans les organes lymphoïdes secondaires. A l'état immature, elles possèdent une très forte capacité de phagocytose et d'endocytose leur permettant de transmettre de manière efficace les informations recueillies aux cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et T) ; pour cette raison, on les nomme couramment « cellules présentatrices d'antigènes **professionnelles ».**
On distingue 2 classes majeures de CD chez la souris (animal modèle) et l'humain : les cellules dendritiques myéloïdes (CDm ou CD conventionnelles) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp). Les CDp circulent dans le sang et sont capables de sécréter de grandes quantités d'IFNα en présence de particules virales, leur conférant un rôle prépondérant dans la réponse immune aux infections virales (Liu, 2005). Leur présence dans l'infiltrat tumoral semble être plutôt délétère et associée à un mauvais pronostic, notamment en raison d'une baisse de production d'IFNα qui favorise l'immunosuppression.

Nous nous intéresserons principalement dans ce travail aux CDm que l'on retrouve sous la forme de cellules de Langherans (peau) ou de CD interstitielles (autres tissus) (Banchereau and Palucka, 2005; Palucka and Banchereau, 2012).

Les CD immatures recrutées au niveau des tissus possèdent des propriétés uniques :

- Captation d'antigènes élevée (phagocytose, endocytose…)
- Faible expression membranaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), mais forte accumulation de molécules du CMH II dans le compartiment endosome-lysosome
- Expression intermédiaire de molécules de co-stimulation des lymphocytes T (CD80/CD86) et faible sécrétion de cytokines
- Expression de récepteurs de chimiokines favorisant la domiciliation des CD dans les tissus (et peu au niveau des organes lymphoïdes secondaires)

Les CD immatures peuvent présenter des auto-antigènes (ou antigènes du soi) aux lymphocytes T (LT) naïfs et induire une tolérance immune soit par délétion ou anergie des LT soit en favorisant l'expansion de LT régulateurs (T_{Reg}) (Figure 3). Seule l'exposition des CD à des signaux de maturation va rendre possible l'acquisition de nouvelles fonctions effectrices.



<u>Figure 3 :</u> Les cellules dendritiques immatures induisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de l'antigène (Banchereau and Palucka, 2005). Les CD « échantillonnent » en permanence l'environnement, capturent des antigènes et migrent, en faible nombre, vers les organes lymphoïdes secondaires. Sans réaction inflammatoire au site de capture, les CD restent à l'état immature et présentent les antigènes aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires. L'absence de signaux de co-stimulation conduit à la fois à une délétion des lymphocytes T et à l'activation de lymphocytes T régulateurs inductibles.

2. Le signal de danger entraîne la maturation des cellules dendritiques et facilite leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires

La CD possède un panel de senseurs moléculaires spécifiques, nommés *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), capables de transduire les signaux de danger perçus. Les PRRs comprennent les familles des *Toll-like receptors* (TLRs) membranaires ou intracellulaires, des *C-type lectin receptors* (CLRs) membranaires, des *NOD-like receptors* (NLRs) et des *RIG-I-like receptors* (RLRs) intracellulaires (Kawai and Akira, 2010).

Les ligands des PRRs sont soit issus de pathogènes, regroupés en *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), soit issus de dégradation cellulaire endogène (ADN, protéines cytoplasmiques ou nucléaires), rassemblés en *Danger-Associated Molecular Pattern Molecules* (DAMPs) (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Seong and Matzinger, 2004).

Les TLRs sont particulièrement bien caractérisés (Lemaitre et al., 1996) et sont présents chez de nombreuses espèces. Chez l'homme, ils sont au nombre de 11 (13 chez la souris) et sont exprimés en particulier par les cellules présentatrices d'antigènes, dont les macrophages, les polynucléaires et les cellules dendritiques. L'interaction des TLRs avec leurs ligands induit l'activation du facteur de transcription NF-κB et de la voie de signalisation des MAP kinases, stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-12, IL-6, TNFα) et l'expression de molécules de co-stimulation (Akira and Takeda, 2004; Medzhitov, 2001). Certains ligands des TLRs ont été identifiés, en voici quelques exemples :

- TLR2 reconnaît une variété de PAMPs (les lipoprotéines bactériennes, les peptidoglycanes et les acides lipotéichoïques) et de DAMPs dont la protéine HMGB1 associée à la chromatine (*high-mobility group box 1*) et la famille des *Heat Shock Proteins* (HSP), impliquée dans le repliement des protéines.
- TLR3 reconnaît des ARN double-brins d'origine virale ou parasitaire
- TLR4 est activé par les LPS bactériens, les glycoprotéines virales ainsi que les protéines HMGB1 et HSP.
- TLR5 reconnaît la flagelline, protéine structurale majeure des bactéries flagellées, dont *P. aeruginosa* qui sera évoquée plus tard dans cette introduction
- TLR9 reconnaît les motifs non-méthylés d'ADN CpG des bactéries ou des virus ainsi que l'ADN endogène relargué par la cellule.

La famille des NLRs est composée de plus de 20 récepteurs qui répondent à une grande variété de PAMPs ou DAMPs, mais également à des signaux intra- et extracellulaires générés

par le système immunitaire inné et adaptatif. Plusieurs sous-types jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée et la régulation de la réponse immune adaptative (Liu et al., 2013):

- les récepteurs NOD1 et NOD2 reconnaissent des fragments de peptidoglycane d'origine bactérienne et, lorsqu'ils sont stimulés, vont activer les voies pro-inflammatoires NF-κB et MAP kinases et induire l'autophagie. Ils jouent également un rôle synergique avec les TLRs pour augmenter la production de cytokines par les cellules dendritiques.
- certains NLRs (notamment NLRP1, 3, 6, 7, 12 et NLRC4, NLRC5…) forment des multimères protéiques après reconnaissance de leur ligand pour donner un complexe appelé inflammasome. L'inflammasome fonctionnel va activer la caspase-1 et entraîner le clivage des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 sous une forme active. NLRC5 est impliqué dans la reconnaissance et la réponse innée à *Listeria monocytogenes*. L'activation de l'inflammasome NLRC5 joue un rôle fondamental dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T $CD8^+$ via la régulation de l'expression des molécules du CMH I. Par ailleurs, de nombreuses études sur NLRC4 ont démontré son rôle dans la réponse innée aux bactéries flagellées. Le flagelle de *Pseudomonas*, *Salmonella* ou *Yersinia*, active l'inflammasome NLRC4 des CD CD8α, qui produisent en réponse de l'IL-1β et de IL-18 ; l'IL-18 stimule la production d'IFNγ qui permet d'augmenter la résistance de l'hôte à l'infection bactérienne (Kupz et al., 2012).

La stimulation des PRRs est donc une voie de maturation clé de la cellule dendritique à l'origine de la réponse immunitaire. Il faut préciser que d'autres signaux permettent également d'induire la maturation des cellules dendritiques dont le ligand CD40 (CD40L, ligand du récepteur CD40 des CD), molécule de co-stimulation exprimée par les lymphocytes $CD4^+$ T helper.

En fonction des signaux de danger captés en périphérie et de la réaction inflammatoire environnante (cytokines en présence), plusieurs phénotypes de CD matures peuvent être obtenus, et orienter la réponse immunitaire adaptative différemment (Reis e Sousa, 2006; Ueno et al., 2011).

C'est seulement après avoir intégré ces signaux de maturation, de manière concomitante à la capture d'antigènes, que la CD pourra déclencher une réaction immune adaptative, et ce, grâce à l'acquisition de propriétés nouvelles :

- Baisse de son activité de capture d'antigènes

- Augmentation de l'expression membranaire des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation des lymphocytes T
- Capacité à sécréter des cytokines immunostimulantes (en particulier l'IL-12)
- Expression de multiples récepteurs de chimiokines (dont *C-C chemokine receptor type 7* (CCR7), *C-C chemokine receptor type 4* (CCR4) et *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4)) favorisant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Palucka and Banchereau, 2012).

3. Interaction CD - Lymphocytes T naïfs

D'une manière générale, les CD matures migrent via les vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires et présentent des antigènes aux LT naïfs, à l'aide des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment le CMH de classe I et sont capables de « s'identifier », à l'exception des cellules germinales. Par contre, seules les cellules présentatrices d'antigène peuvent présenter des peptides sur les molécules du CMH de classe II.

Les peptides apprêtés par le CMH I proviennent essentiellement du compartiment intracellulaire : il s'agit de produits de dégradation de protéines d'origine endogène, ou provenant de pathogènes intracellulaires. Les protéines sont fragmentées dans le cytosol par le protéasome ou par d'autres protéases. Les fragments peptidiques sont ensuite transportés à travers la membrane du réticulum endoplasmique par les protéines de transport TAP (*Transporter associated with antigen processing*). La synthèse et l'assemblage de la chaîne lourde et de la β-2-microglobuline du CMH I se produisent dans le réticulum endoplasmique puis forment un complexe stable avec le peptide, qui est transporté à la surface cellulaire.

Les peptides d'origine exogène, phagocytés ou endocytés par la cellule, et ayant fait l'objet d'une dégradation dans le compartiment endosomal, sont présentés via le CMH II (Trombetta and Mellman, 2005). Les chaînes α et β du CMH II, ainsi qu'une chaîne invariante, sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique puis transportées à travers l'appareil de Golgi pour atteindre le compartiment endosomal. La chaîne invariante va être digérée, et les fragments peptidiques produits à partir de la protéine exogène pourront s'associer avec les molécules du CMH II pour former un complexe qui est transporté à la surface de la cellule. Toutefois, certains antigènes d'origine exogène peuvent être apprêtés par le CMH I, par un mécanisme de présentation « croisée » TAP-dépendant (voie cytosolique) ou TAP-indépendant (voie vacuolaire), propre à certains phénotypes de cellules dendritiques

(particulièrement les CD CD8α). Deux principales voies intracellulaires de présentation croisée d'antigènes d'origine exogène ont été décrites : la voie cytosolique et la voie vacuolaire (Figure 4) (Joffre et al., 2012).

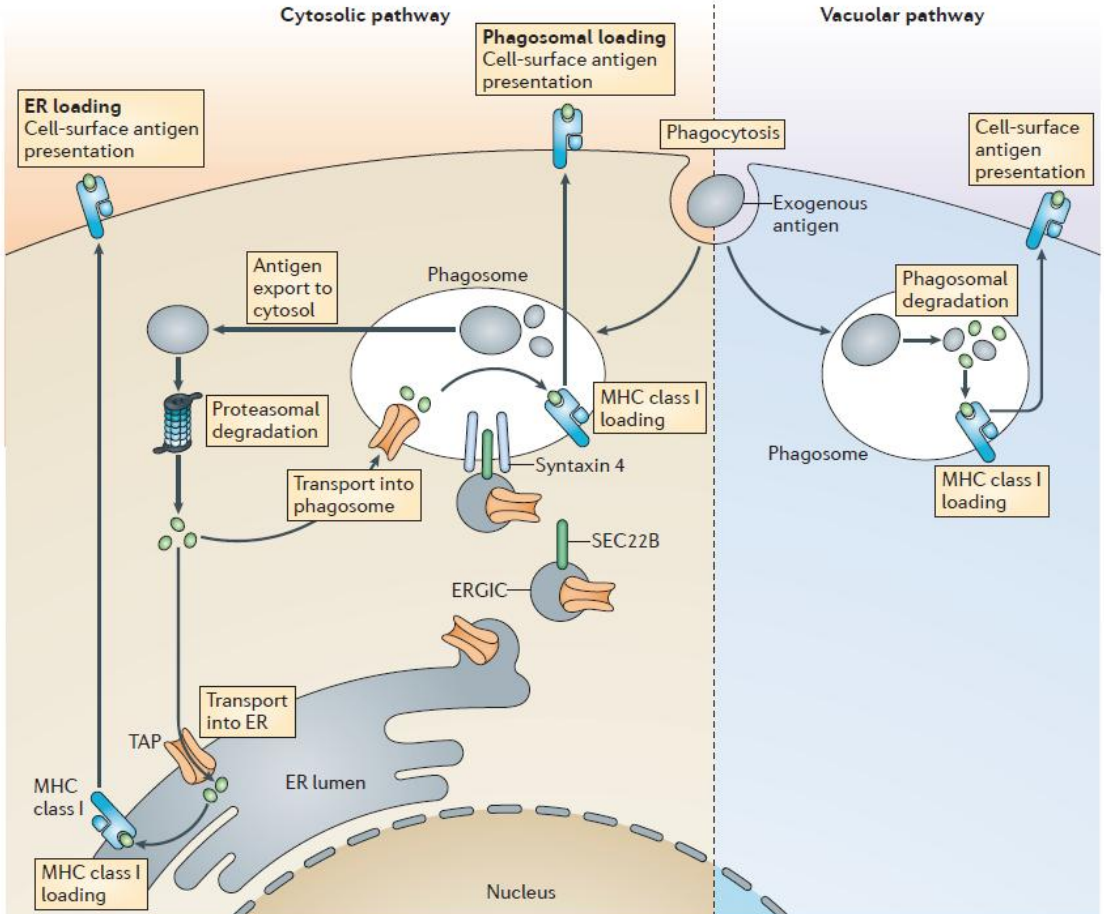


Figure 4: Voies intracellulaires de présentation croisée. (Joffre et al., 2012)

Dans la voie cytosolique, les protéines internalisées accèdent au cytosol où elles sont dégradées par le protéasome et suivent alors la voie classique de présentation par les molécules du CMH I. Dans la voie vacuolaire, les antigènes sont dégradés dans le phagolysosome et les peptides sont chargés sur le CMH I.

Les CD régulent cette capacité de présentation « croisée » lors de leur maturation et la voie d'activation CD40/CD40L a été décrite comme étant un élément favorisant ce phénomène. Par ailleurs, l'engagement du CMH II avec le TCR des lymphocytes T CD4+ favoriserait également la présentation « croisée » (Joffre et al., 2012).

Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs vont interagir avec les CD via une reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur du lymphocyte T (TCR). Les lymphocytes T CD4+ naïfs vont reconnaître le complexe CMH II - peptides alors que les lymphocytes T CD8+ naïfs

vont s'associer aux complexes CMH I - peptides. En présence de molécules de co-stimulation (entre autres CD80/CD86) et des cytokines sécrétées par la CD, les lymphocytes T pourront se différencier en lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène (Figure 5).

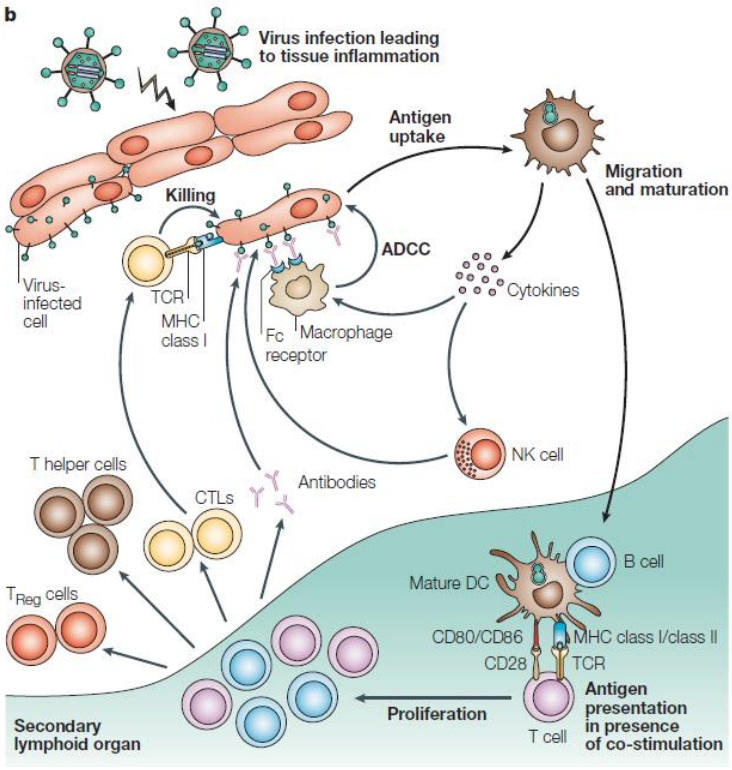


Figure 5 : Les cellules dendritiques matures induisent l'immunité (Banchereau and Palucka, 2005b). L'inflammation (exemple d'une infection virale) au niveau des tissus induit la maturation des cellules dendritiques et leur migration en grand nombre vers les organes lymphoïdes secondaires. Les CD matures expriment les complexes CMH-peptide à leur surface ainsi que des molécules de co-stimulation appropriées. Cela permet la pré-activation des lymphocytes T CD4+ helper et des T CD8+ cytotoxiques (CTL), l'activation des lymphocytes B et l'initiation de la réponse immune adaptative. Pour contrôler la réponse immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25+) sont aussi activés. *ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; NK : Natural Killer : TCR : T-cell receptor*

L'ensemble de ces interactions constitue la « synapse immunologique » qui va conditionner la suite de la réponse immunitaire adaptative (Bromley et al., 2001).

Comme nous l'avons vu précédemment l'absence ou la faiblesse de la co-stimulation (état immature de la CD) entraîne le lymphocyte T vers un état d'anergie. Ce phénomène est nécessaire afin d'éviter qu'une réaction immunitaire non appropriée se produise contre des antigènes du soi ou du non soi, présentés en l'absence de signaux de danger. Ainsi, l'anergie des lymphocytes T est également décrite dans le cas de la présentation par la CD des antigènes tumoraux, appartenant majoritairement au soi ou au soi modifié ; et ce d'autant plus que l'environnement tumoral interfère avec la maturation des cellules présentatrices d'antigènes, diminuant alors leur capacité de présentation.

Nous verrons qu'il sera nécessaire de rompre cette tolérance à l'encontre des antigènes tumoraux par l'apport d'un signal de danger fort, conjointement au message antigénique, pour générer une réponse immunitaire contre la tumeur.

II. Orientation de la réponse T et régulation

1. Polarisation des lymphocytes T CD4+

Les CD matures présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes TCD4+ naïfs via l'interaction CMH II-peptide – TCR dans les organes lymphoïdes secondaires, ce qui conduit à la pré-activation des LT CD4+ qui produisent de l'IL-2, mais aussi à la surexpression de facteurs de transcription spécifiques qui vont conditionner le type de réponse T CD4+. La production d'IL-2 va favoriser la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur expansion clonale (Palucka and Banchereau, 2012).

Les LT CD4+ vont se différencier en lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène et donner plusieurs types de réponses activatrices ou inhibitrices de la réponse immunitaire. L'orientation de la réponse est liée au profil cytokinique des CD (plus largement des cellules présentatrices d'antigènes), qui dépend de la manière dont elles ont été maturées (signaux perçus) dans les tissus périphériques ou les organes lymphoïdes secondaires.

On distingue 6 réponses de type T helper (Th1, Th2, Th17, T_{FH} et plus récemment Th9 et Th22) et une réponse de type T régulatrice (T_{Reg}) (Muranski and Restifo, 2013; O'Shea and Paul, 2010) ; nous nous limiterons dans cette partie à une rapide description de ces voies de différenciation des lymphocytes T CD4+ activés (Figure 6) :

- La réponse de type Th1 (surexpression du facteur de transcription T-bet) est favorable à une immunité anti-tumorale car elle « apporte » un soutien nécessaire au développement de la réponse T CD8+ cytotoxique. Elle est induite par la présence d'IL-12 et d'IFNγ et est caractérisée par une sécrétion d'IFNγ, de TNFα et β favorisant la différentiation et l'expansion clonale des lymphocytes TCD8+ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). De plus, l'IFNγ, le TNFα et β activent les macrophages et déclenchent le recrutement des leucocytes au site inflammatoire. La réponse Th1 est également impliquée dans le développement d'une réponse T mémoire, favorable à une protection durable.

- La réponse de type Th2 (surexpression du facteur de transcription Gata3) est surtout induite en l'absence d'IL-12 et en présence d'IL-4 et se définit par la sécrétion d'IL-4, -5 et -13 favorisant une réponse des lymphocytes B (production d'anticorps dirigés contre l'antigène) et des polynucléaires éosinophiles et basophiles. La réponse de type Th2 dans l'immunité anti-

tumorale reste peu décrite et semble être peu utile. En revanche, elle est particulièrement importante dans la réponse aux pathogènes extracellulaires et aux parasites.

- La réponse de type Th17 (surexpression du facteur de transcription RORγt), de découverte récente, est induite en présence de l'association de TGF-β et d'IL-6 puis stabilisée et amplifiée en présence d'IL-23. Elle est caractérisée par la production d'IL-17, -21 et -22 et joue un rôle dans la protection contre certaines infections opportunistes fongiques et bactériennes (*Candida, Staphylococcus…*) et plus généralement contre les bactéries extracellulaires (dont *Pseudomonas aeruginosa*). Un développement excessif de cette réponse est à l'origine de nombreuses maladies autoimmunes (sclérose en plaques, psoriasis, maladie de Crohn, etc…). Son rôle dans l'immunité anti-tumorale semble être multiple et est actuellement très étudié. Selon le contexte, cette réponse pourrait favoriser la tumeur ou au contraire jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la progression tumorale. La détermination exacte de la nature de la réponse Th17 dans le contexte du microenvironnement tumoral sera probablement un facteur à considérer dans le développement de futures immunothérapies ciblées (Martin-Orozco et al., 2009; Muranski et al., 2008; Nuñez et al., 2013; Steinman and Banchereau, 2007; Zou and Restifo, 2010).

- La réponse de type T *follicular helper* (T_{FH}) (surexpression du facteur de transcription Bcl-6) a lieu dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires et aide les lymphocytes B à se différencier en plasmocytes.

Les T_{FH} expriment le récepteur CXCR5 de manière constitutive ce qui facilite leur recrutement au niveau des follicules B (Fazilleau et al., 2009; Laurent et al., 2010). L'activation des lymphocytes B est favorisée par la sécrétion d'IL-21 et IL-4 (Nurieva et al., 2008). Jusqu'à présent la réponse T_{FH} n'avait jamais été décrite dans l'immunité anti-tumorale, mais une étude récente a démontré la présence de LT CD4+ *follicular helper* produisant CXCL13 dans des tumeurs du sein fortement infiltrées. Cet infiltrat est corrélé à la réponse clinique et est un facteur de bon pronostic dans le cancer du sein. La présence des T_{FH} est associée à une augmentation de la production d'IFNγ par les LT CD4+ de type Th1 et les LT CD8+ présents dans l'infiltrat tumoral (Gu-Trantien et al., 2013).

- La réponse de type T régulatrice (T_{Reg}) (surexpression du facteur de transcription Foxp3) va moduler la réponse immune (principalement Th1) en régulant la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi (ou dans certains cas du non soi) et en évitant ainsi le développement de réponses auto-immunes. Les T_{Reg} produisent des cytokines immunosuppressives dont le TGF-β et l'IL-10. Ils expriment fortement la chaîne α du récepteur membranaire de l'IL-2 (CD25) ainsi que le facteur de transcription *Forkhead box P3* (Foxp3), qui permet la répression de la

transcription d'un certain nombre de gènes clés suite à la stimulation du TCR. La fonction des T_{Reg} dans la modulation de la réponse anti-tumorale a été beaucoup étudiée ces dernières années. Leur rôle délétère dans le microenvironnement tumoral, où ils suppriment l'action des LT effecteurs par leur production de cytokines immunosuppressives, en fait une cible d'intérêt (Finn, 2008; Savage et al., 2013).

Bien que cette polarisation de la réponse T CD4+ soit acquise par les immunologistes, de récents travaux proposent une vision moins stratifiée, suggérant une expression transitoire des facteurs de transcription et une flexibilité du profil de production de cytokines des lymphocytes T CD4+ activés. Il semblerait, par ailleurs, que l'engagement vers la différentiation soit variable en fonction du phénotype T helper (les lymphocytes Th17 présenteraient une différentiation peu avancée leur conférant une forte plasticité) (Figure 6) (Muranski and Restifo, 2013; O'Shea and Paul, 2010).

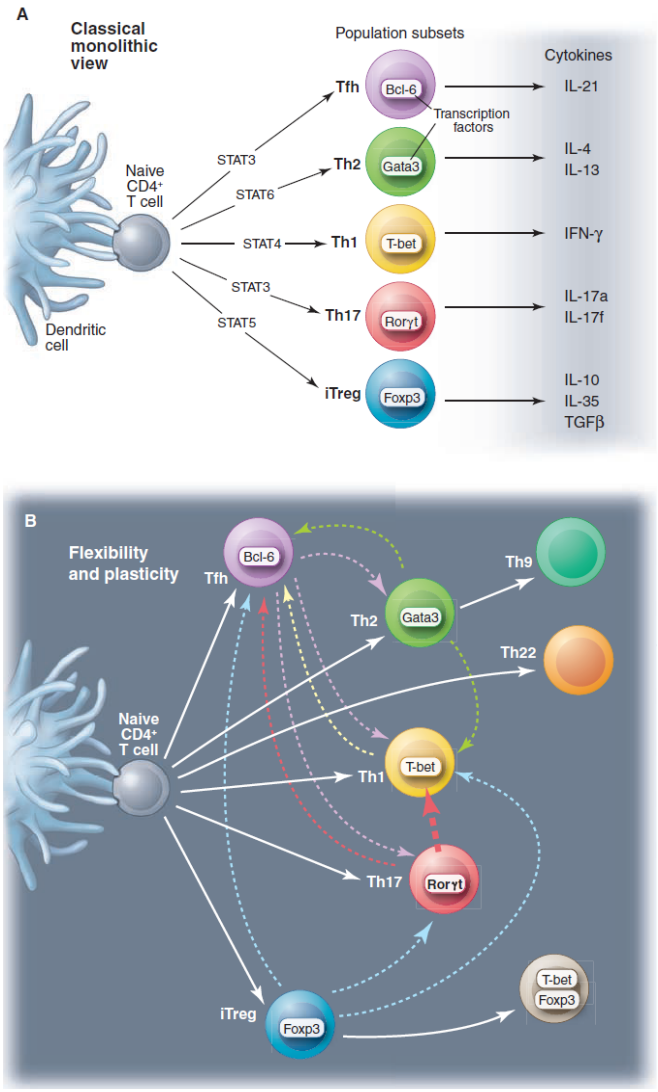


Figure 6 : Différentiation des lymphocytes T CD4+ (O'Shea and Paul, 2010).

2. Lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTLs)

Suite à leur interaction avec les CD matures, les LT CD8+ naïfs peuvent se différencier en effecteurs T cytotoxiques (CTLs) spécifiques de l'antigène et subir une phase d'expansion clonale (facilitée par l'IL-2 sécrétée par les LT CD4+). Cette prolifération est associée à une modification de leurs propriétés migratoires, notamment par la diminution d'expression du récepteur de domiciliation CD62L (*L-selectin*) à la surface de la cellule, facilitant la circulation des CTLs des organes lymphoïdes secondaires vers les tissus périphériques.

Les CTLs vont pouvoir reconnaitre les cellules cibles par l'intermédiaire des interactions TCR – CMH I-peptide. Cette reconnaissance déclenche plusieurs mécanismes, dont le relargage de molécules cytotoxiques qui vont entrainer la lyse des cellules cibles, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

L'activation de l'apoptose des cellules cibles par les CTLs peut être médiée par l'induction de deux voies différentes:

- **la voie perforine-granzymes** : le modèle le plus récent suggère que les granzymes B produits par les CTLs se lient à la membrane de la cellule cible, et que la perforine forme des pores induisant un flux de Ca^{2+}. Ce flux active l'endocytose des parties de la membrane contenant les pores, provoquant l'entrée des granzymes B qui peuvent induire l'apoptose de la cellule cible par l'intermédiaire de l'activation de la voie des caspases (Keefe et al., 2005).
- **la voie des récepteurs de mort Fas-FasL** : FasL, un ligand d'origine lymphocytaire, se lie au récepteur de mort Fas présent à la surface de la cellule cible, entrainant l'activation de la voie des caspases et la mort de la cellule par apoptose (Strasser et al., 2009).

Hormis leur fonction cytolytique, les CTLs sont capables de sécréter différents médiateurs de la réponse immunitaire, dont l'IL-2, l'IFNγ le TNFα ainsi que les chimiokines CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES) et XCL1 (Dorner et al., 2002). L'IL-2 a une action autocrine sur les CTLs, renforçant leur prolifération (D'Souza and Lefrançois, 2003). L'IFNγ active les LT CD8+ et les macrophages, induit l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I à leur surface, ainsi qu'à la surface des cellules cibles et des CPAg, facilitant la présentation de l'antigène aux cellules effectrices. Enfin, le TNFα, CCL3, CCL5 et XCL1 participent au maintien de la réponse inflammatoire.

3. Régulation des lymphocytes T activés (immunomodulation)

Les lymphocytes T possèdent plusieurs récepteurs de co-signalisation (co-stimulation ou co-inhibition) qui vont réguler la signalisation du TCR et ainsi jouer sur l'activation des LT (Chen and Flies, 2013). Le répertoire des récepteurs de co-signalisation des LT est particulièrement varié et dépend de l'environnement tissulaire. Nous nous intéresserons ici aux voies de signalisation les mieux caractérisées, qui ont un intérêt pour l'immunothérapie anti-tumorale.

Nous avons vu que pour obtenir une activation efficace des LT, l'interaction TCR - CMH-peptide devait être accompagnée de signaux de co-stimulation, dont l'association CD28-protéines B7 (CD80 ou CD86). Ces signaux permettent aux LT de proliférer, d'acquérir des fonctions effectrices, et éventuellement de migrer vers les tissus périphériques. Toutefois, la voie de signalisation du TCR induit aussi l'expression de CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), un homologue de CD28, spécifique des LT, qui possède une forte affinité pour les protéines B7 des cellules présentatrices d'antigènes. L'interaction de CTLA-4 avec les protéines B7 peut ainsi bloquer l'activation des LT en entrant en compétition avec l'interaction CD28-B7. CTLA-4 est décrit comme un modulateur, capable de restreindre l'activité des LT afin de minimiser les lésions des tissus sains en cas de « suractivation » des LT. Une seconde molécule exprimée tardivement à la surface des LT activés, PD-1 (*programmed cell death 1*), émet également un signal inhibiteur lors de l'interaction avec son ligand PD-L1 localisé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (Sharma et al., 2011) (Figure 7).

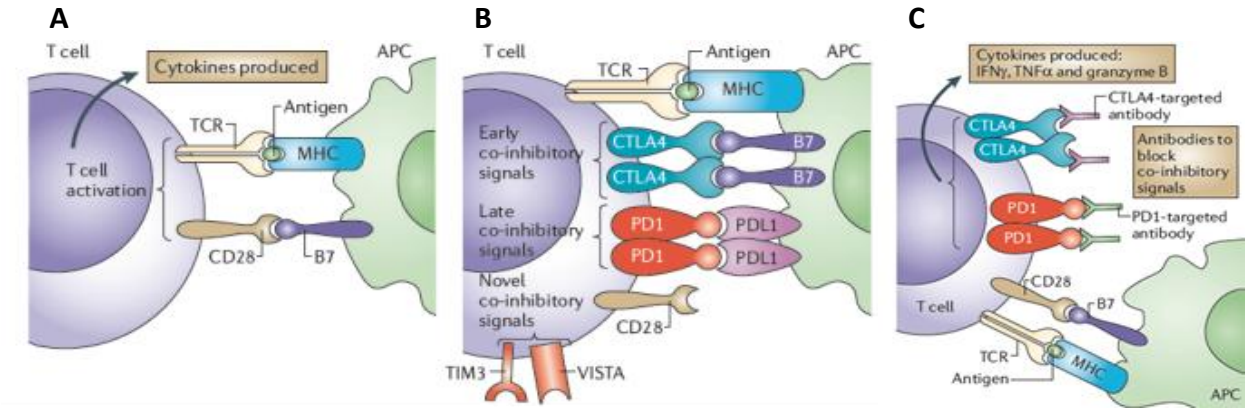


Figure 7 : Mécanismes simplifiés de stimulation et d'inhibition des lymphocytes T et thérapies ciblant ces voies (adapté de Sharma *et al.* 2011). A. L'activation des LT débute par l'interaction entre le TCR des LT et l'association CMH-peptide sur les CPAg. **B.** Cette activation est limitée par les molécules CTLA-4 ou PD-1 qui interagissent respectivement avec CD28 et PDL1 **C.** Stratégies pour maintenir l'activation des LT spécifiques de la tumeur, ciblant CTLA-4 et PD-1 pour neutraliser les récepteurs de co-inhibition.

Enfin d'autres voies régulatrices de l'activation des LT faisant intervenir les molécules TIM3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*), VISTA (*V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*), BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) ou encore LAG 3 (*Lymphocyte activation gene 3*) ont été identifiées récemment (Pardoll, 2012).
Ces différentes voies de co-signalisation sont exploitées pour le développement d'immunomodulateurs, et plus précisément d'anticorps monoclonaux antagonistes capables d'inhiber l'interaction CTLA-4-B7 ou PD1-PD-L1 et ainsi favoriser l'activation et la survie des lymphocytes T spécifiques (Pardoll, 2012). L'anticorps ipilimumab (Yervoy®) anti-CTLA-4 a notamment obtenu une AMM en 2011 dans le traitement du mélanome métastatique non opérable (Hodi et al., 2010).

III. La réponse T CD8+ mémoire

Le but des immuno-oncologistes est d'obtenir une ou des réponse(s) T CD8+ spécifique(s) d'antigènes tumoraux suffisamment robuste(s) et durable(s) pour générer une réponse protectrice à long terme contre la tumeur. (Palucka and Banchereau, 2012)

Bien que l'immunothérapie anti-tumorale active ait démontré sa capacité à générer une forte réponse immune contre des antigènes de tumeurs, seuls de rares cas de rémission complète à long terme ont été recensés. L'obtention d'une mémoire immunologique fait donc partie des critères de développement d'une immunothérapie anti-tumorale.
Cette propriété du système immunitaire adaptatif permet à l'organisme de répondre rapidement et de manière plus intense lors d'un second challenge avec un antigène. Toutes les cellules du système immunitaire adaptatif (LT CD4+, LB, LT CD8+) sont capables de développer une réponse mémoire ; dans cette partie nous nous intéresserons surtout à la réponse mémoire T CD8+ décrite chez la souris.
Suite à la phase effectrice, caractérisée par une forte prolifération clonale, et à l'élimination du pathogène ou de la tumeur, les LT CD8+ vont subir une phase de contraction puis une différentiation en cellules mémoires (Figure 8).

1. La contraction clonale

De nombreuses études sur les pathogènes viraux ou bactériens ont démontré qu'une phase de contraction massive des lymphocytes LT CD8+ spécifiques avait lieu suite à leur élimination par le système immunitaire. En effet, 90 à 95% des LT CD8+ meurent par apoptose lors de cette phase de contraction clonale (Kaech et al., 2003) (Figure 8).

Il semble que cette étape de contraction soit contrôlée précocement lors de l'activation des LT CD8+ par la génération de deux populations différentes (Joshi et al., 2007; Kaech et al., 2003):

-une première population (5-10% des LT CD8+ spécifiques) composée de précurseurs de cellules mémoires à longue durée de vie.

-une seconde, beaucoup plus conséquente, composée d'effecteurs à un stade de différenciation avancé, très sensibles à l'apoptose.

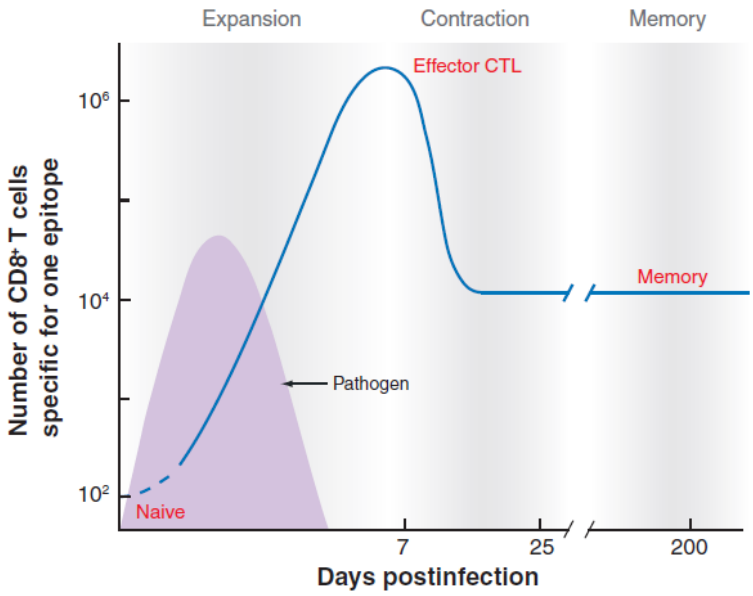


Figure 8: Illustration graphique des cinétiques d'expension des lymphocytes T CD8+ naïfs à la suite d'une infection chez la souris par un pathogène virulent de type *Listeria monocytogenes*, LCMV, VSV ou le virus de la Vaccine. On estime que chez la souris il existe entre 50 et 200 LT CD8+ naïfs spécifiques d'un quelconque épitope (répertoire TCD8). Après 24h environ, ces précurseurs subissent entre 15 et 20 divisions et génèrent des millions de CTLs effecteurs 7 ou 8 jours post-infection. Lorsque que le pathogène est éliminé, la majorité des cellules effectrices meurent, laissant place à un pool de LT CD8+ spécifiques mémoire D'après (Williams and Bevan, 2007).

2. Différentiation en cellules mémoires

Plusieurs modèles ont été établis pour définir la différenciation des LT CD8+ en cellules mémoires. Le modèle de différenciation linéaire semble être le mieux accepté par les immunologistes. Il décrit que les T CD8+ mémoires se différencient à partir de précurseurs présents dans la population de cellules effectrices (Kaech and Wherry, 2007; Kaech et al., 2003; Sarkar et al., 2008). Cette diversité apparaît rapidement au cours de la réponse effectrice. Quatre jours après l'initiation de la réponse, plusieurs marqueurs sont exprimés de manière hétérogène sur les cellules effectrices (Kaech et al., 2003), notamment les marqueurs CD127 et KLRG1 (*Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*), qui sont

respectivement le récepteur à l'IL-7 et le récepteur inhibiteur des cellules NK (*Natural Killer*). Les cellules T CD8+ naïves et T CD8+ mémoires expriment le récepteur à l'IL-7, qui participe au maintien de leur homéostasie et contribue partiellement à leur prolifération (Schluns et al., 2000).

Suite à une infection, l'expression de CD127 est inhibée en 48 heures environ, et seule une petite proportion des LT CD8+ effecteurs (qui deviendront mémoires) expriment à nouveau ce marqueur environ 8 jours après l'initiation de la réponse effectrice (Kaech et al., 2003). Egalement, suite à l'activation de la réponse effectrice, il a été montré par Joshi *et al.* que deux populations se différenciaient en 4 à 5 jours en réponse à une infection virale *in vivo* : KLRG1$^{\mathbf{Hi}}$ et KLRG1$^{\mathbf{Low}}$. Ces deux populations ont des fonctions effectrices similaires mais les cellules KLRG1$^{\mathbf{Low}}$ expriment à nouveau le marqueur CD127 au bout de 9 jours après initiation de la réponse. Il a été démontré que la survie de ces 2 sous-populations étaient différentes, les cellules KLRG1$^{\mathbf{Hi}}$ ayant une moins bonne survie lors de la phase de contraction ce qui suggère que ces cellules ont un faible potentiel à générer des cellules mémoires. (Joshi et al., 2007).

Ces cellules KLRG1$^{\mathbf{Low}}$CD127$^{\mathbf{Hi}}$ ont des fonctions effectrices similaires à celles des cellules KLRG1$^{\mathbf{Hi}}$CD127$^{\mathbf{Low}}$ mais ont un phénotype de cellules mémoires ainsi que des capacités d'auto-renouvellement et de réponse à un rappel antigénique supérieures. Elles sont nommées respectivement MPEC (*Memory Precursor Effector Cells*) et SLEC (*Short Lived Effector Cells).*

3. Propriétés des cellules mémoires

Les cellules mémoires sont impliquées dans la protection de l'organisme contre des réinfections ou des réactivations tumorales et ont la capacité de répondre beaucoup plus rapidement, plus fortement et de manière plus adaptée, et ce pour plusieurs raisons :

- Les LT CD8+ mémoires sont présents en plus grand nombre que les lymphocytes T CD8 naïfs (Ahmed, 1996; Blattman et al., 2002) et ont une capacité d'expansion plus rapide (Pihlgren et al., 1999).
- Ils bénéficient de fonctions améliorées, notamment par l'expression accélérée de fonctions effectrices. Il a notamment été démontré que la sécrétion d'IFNγ était plus précoce suite à un rappel antigénique (Bachmann et al., 1999).
- Les cellules mémoires sont polyfonctionnelles, plusieurs études ont démontré que la protection conférée par les LT CD8+ ou LT CD4+ mémoires était liée au nombre de

cytokines (IL-2, IFNγ, TNFα) et chimiokines qu'elles étaient capables de co-produire en réponse à un rappel antigénique, mais également à l'avidité du TCR pour l'antigène (Almeida et al., 2007; Betts et al., 2006; Darrah et al., 2007; Precopio et al., 2007).

- Ils peuvent être stimulés indépendamment du TCR, de manière semblable aux cellules Natural Killer (NK) (Berg et al., 2003)

4. Sous-types de cellules mémoires

La réponse mémoire et plus précisément la réponse LT CD8+ mémoire a été largement décrite et étudiée ces 15 dernières années. Il existe deux sous-types de cellules mémoires : les lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}) et les lymphocytes T mémoires effecteurs (T_{EM}). Ces deux phénotypes expriment CD127 mais sont caractérisés par une expression hétérogène des antigènes de différenciation CD62L (L-selectin) et CCR7 (récepteur aux chimiokines de type 7) (Sallusto et al., 1999).

Les T_{CM} expriment CD62L et CCR7 alors que les T_{EM} ont une faible expression de ces marqueurs impliqués dans la domiciliation au niveau des organes lymphoïdes secondaires, suggérant que ces 2 populations ont des capacités de circulation différente (Sallusto et al., 1999). Plusieurs études sont venues conforter ces observations, notamment *in vivo* chez la souris (Masopust et al., 2001; Wherry et al., 2003).

Les T_{CM} sont localisés principalement dans les organes lymphoïdes secondaires et en plus petite quantité dans le sang, alors qu'on retrouve les T_{EM} essentiellement dans les tissus périphériques, dans la rate et dans le sang. Ils diffèrent aussi par leurs fonctions effectrices (Masopust et al., 2001; Sallusto et al., 1999) ; en effet bien qu'ils semblent produire des quantités identiques d'IFNγ ou de TNFα en réponse à un rappel antigénique, une plus grande proportion de T_{CM} produit de l'IL-2, ce qui va certainement favoriser leur prolifération dans les organes lymphoïdes lorsqu'ils sont confrontés à l'antigène (Wherry et al., 2003). Les T_{EM} ont une activité cytolytique *in vivo* beaucoup plus importante que celle des T_{CM} en raison d'une expression plus importante de perforine et de granzyme B (Bachmann et al., 1999). Ils sont donc capables de répondre immédiatement à un challenge infectieux ou tumoral en périphérie alors que les T_{CM} répondent plus tardivement mais de manière prolongée grâce à leur propriété de renouvellement des effecteurs (Hikono et al., 2006).

5. Rôle des T CD4+ helper dans la réponse T CD8+ mémoire

Certaines études chez la souris ont montré l'importance des LT CD4+ helper dans le maintien de la population mémoire et lors du rappel antigénique des LT CD8+ mémoires, mais ils ne semblent pas indispensables pour la différentiation des LT CD8+ effecteurs en LT CD8+ mémoires (Janssen et al., 2003; Kaech et al., 2003; Shedlock and Shen, 2003; Sun et al., 2004). En effet, il est démontré qu'en l'absence de T CD4+ helper, les lymphocytes T CD8+ mémoires sont générés normalement suite à une activation primaire, mais que leur nombre décroit ensuite progressivement et que leur prolifération est réduite lors d'un rappel antigénique (Sun and Bevan, 2003) (Figure 9).

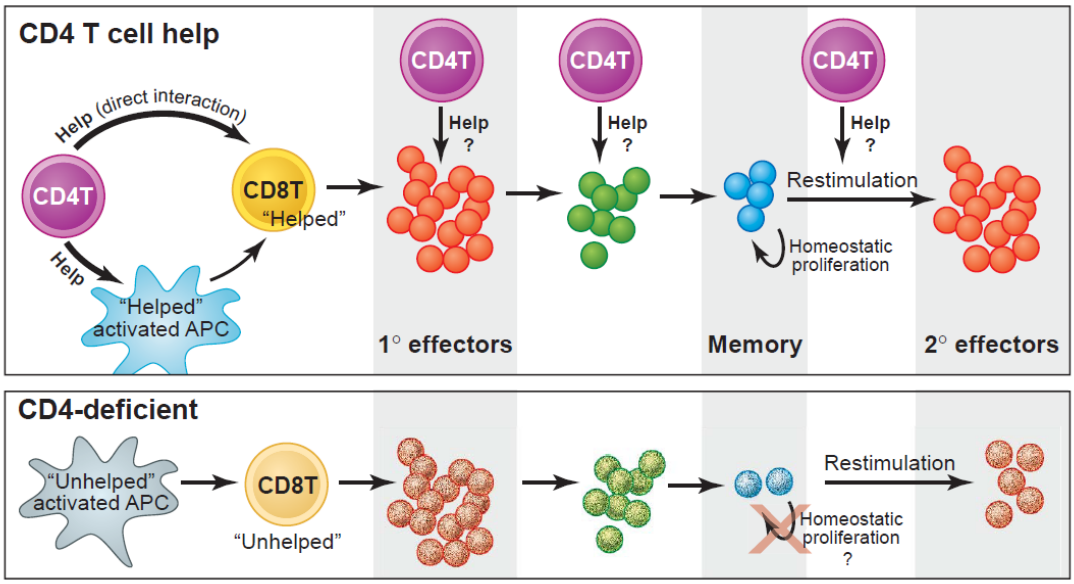


Figure 9 : Le soutien des LT CD4+ helper est requis pour l'obtention d'une réponse T CD8+ mémoire protectrice (Kaech and Ahmed, 2003).

6. Importance de la réponse mémoire dans l'immunité anti-tumorale

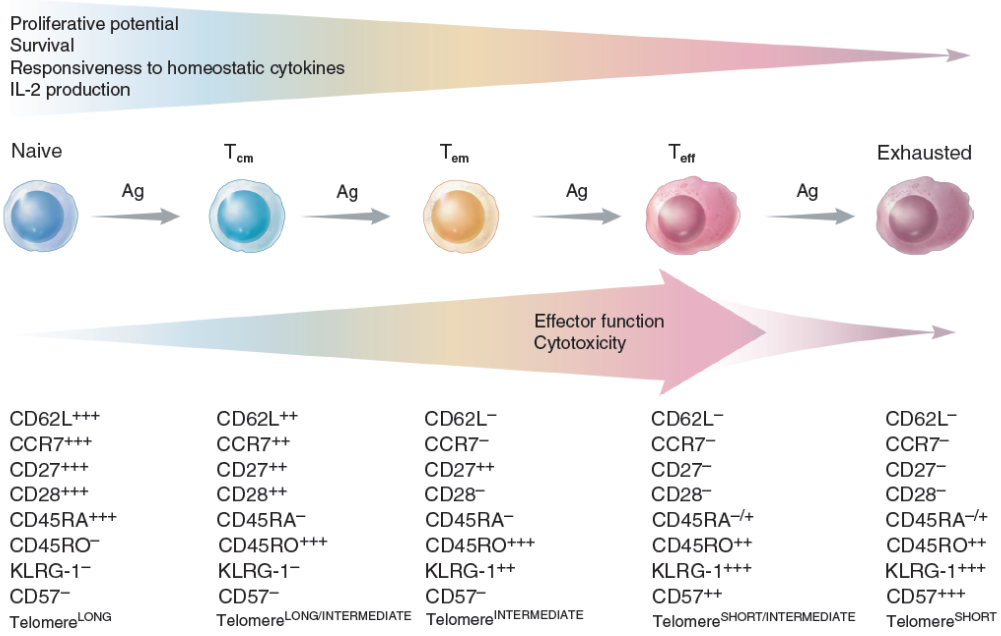
Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des réponses T CD8+ mémoire effectrice ou centrale ont été initialement décrits dans le cas d'infection virale aiguë ou chronique. Ces études peuvent potentiellement servir de « modèle » pour expliquer l'échec de certaines vaccinations anti-tumorales qui peinent à développer une protection à long terme. La question de savoir laquelle des deux populations T_{CM} ou T_{EM}, sinon les deux, doit être obtenue pour le développement d'une immunothérapie efficace est d'un intérêt majeur. Chez la souris et le primate, plusieurs études ont démontré que les LT CD8+ T_{CM} étaient plus aptes que les T_{EM} à protéger contre un challenge viral ou bactérien (Berger et al., 2008; Vaccari et

al., 2005; Wherry et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris en challenge tumoral (Chapuis et al., 2012; Klebanoff et al., 2005).

Cette capacité de protection supérieure des T_{CM} a été corrélée à leur pouvoir de prolifération supérieure lors d'un rappel antigénique en comparaison aux T_{EM} (Klebanoff et al., 2005; Wherry et al., 2003). Ceci permet la génération d'une grande quantité de cellules effectrices qui peuvent infiltrer massivement les sites périphériques de l'infection ou de la tumeur.

Cependant, il faut tempérer ces résultats car plusieurs travaux n'ont pas vérifié cette protection supérieure des T_{CM} (Bachmann et al., 2005a, 2005b; Olson et al., 2013; Roberts and Woodland, 2004). Il est probable que l'efficacité des réponses T_{CM} ou T_{EM} soit dépendante de l'agent infectieux ou du type de tumeur (Williams, 2013).

Enfin il est décrit qu'une stimulation chronique par un antigène (infection virale, tumeur) est délétère pour la réponse TCD8+ mémoire car elle tend à orienter les lymphocytes TCD8+ vers un stade de différenciation élevée, diminuant leur capacité de prolifération (Figure 10) (Klebanoff et al., 2006).



<u>Figure 10</u>: Changement fonctionnels et phénotypique des LT CD8+ induits par une stimulation chronique par l'antigène.(Klebanoff et al., 2006)

IV. Quelle(s) réponse(s) T pour une immunité anti-tumorale ?

Les caractéristiques de la réponse T permettant d'obtenir une immunité anti-tumorale efficace ne sont pas encore totalement connues, bien qu'il soit démontré que la réponse T CD8+ cytotoxique joue un rôle indéniable dans l'élimination des cellules tumorales (Rosenberg et al., 2004). Néanmoins, certains vaccins anti-tumoraux ayant conduit à une forte production de CTLs spécifiques n'ont pas nécessairement abouti à une destruction de la tumeur (Mocellin et al., 2004; Peterson et al., 2003; Rosenberg et al., 2004, 2005). Il s'agit donc d'une condition nécessaire mais non suffisante.

Il est important d'éclaircir le rôle de la réponse T CD4+, qui a bien souvent été « délaissée » au profit de la réponse T CD8+ cytotoxique dans le développement de l'immunothérapie anti-tumorale. En effet la majorité des essais cliniques d'immunothérapie anti-tumorale active ou passive (adoptive) se sont focalisés sur cette réponse, soit par une présentation unilatérale des antigènes de tumeur via le CMH I (i.e. injection de peptides épitopes présentées par le CMH I) ou par le seul transfert adoptif de CTLs spécifiques de la tumeur.

Le rôle des lymphocytes T CD4+ helper a été récemment mieux caractérisé. Il a notamment été démontré que la génération d'une unique réponse T CD4+ helper spécifique d'antigènes de mélanome pouvait avoir une efficacité directe sur la tumeur (Baxevanis et al., 2000; Quezada et al., 2010; Restifo et al., 2012; Xie et al., 2010) ; cette réponse serait susceptible de jouer un rôle plus important que la réponse CTLs (Hunder et al., 2008; Perez-Diez et al., 2007). Dans le cas du mélanome, une expression constitutive des molécules du CMH II est retrouvée sur les cellules tumorales elles-mêmes, ce qui pourrait expliquer l'activité anti-tumorale directe des lymphocytes T CD4+ (Rodríguez et al., 2007).

Plusieurs autres études démontrent qu'une réponse T CD4+ spécifique de la tumeur préviendrait la tolérance immune, viendrait amplifier la réponse des CTLs et faciliterait leur recrutement au site tumoral, tout en potentialisant leur fonction cytolytique. Le recrutement des CTLs serait favorisé par la production de chimiokines liée à la production d'IFNγ par les lymphocytes T CD4+ intratumoraux (Bos and Sherman, 2010; Marzo et al., 2000; Shafer-Weaver et al., 2009).

Une étude plus récente vient confirmer cette « plus-value » d'une coactivation de lymphocytes T CD4+ helper et de CTLs spécifiques de la tumeur. Aarntzen *et al.* ont vacciné des patients atteints de mélanomes avec des CD matures chargées par des peptides CMH I uniquement ou CMH I et II des antigènes gp100 et tyrosinase. Des CTLs fonctionnels (production d'IFNγ) spécifiques des antigènes gp100 et tyrosinase ont été détectés dans

l'infiltrat tumoral et dans le sang pour 4 patients sur 15 vaccinés avec les CD chargées avec des épitopes du CMH I et II et 1 seul patient sur 14 vaccinés avec les CD chargées avec les peptides CMH I. Lorsqu'ils observaient une réponse T CD4+ spécifique des antigènes de tumeur, celle-ci était associée à une réponse CTLs spécifique de ces mêmes antigènes. Globalement la vaccination avec des CD chargées avec des peptides CMH I et CMH II conduit à une amélioration de la réponse clinique en comparaison au traitement de référence et potentialise la réponse CTLs (Aarntzen et al., 2013).
Enfin, comme nous avons pu le voir précédemment les CD4+ T helper sont importants dans le maintien à long terme de la réponse mémoire CTLs (Faiola et al., 2002; Janssen et al., 2003) qui permet de protéger les patients d'une éventuelle récidive.

En résumé, l'immunité adaptative anti-tumorale fait appel à une réponse CD8+ cytotoxique spécifique et durable, probablement indispensable à l'éradication de la tumeur mais non suffisante, et doit préférentiellement mobiliser une réponse CD4+ T helper spécifique (Th1, Th17?) favorable à l'amplification et au maintien de la réponse CTLs.

V. Induire ou remobiliser une immunité anti-tumorale : un défi multi-étapes ?

Suite à la description des évènements permettant d'activer et de réguler l'immunité adaptative cellulaire, 3 éléments semblent être déterminants pour le développement d'une immunité anti-tumorale efficace (Appay et al., 2008; Mellman et al., 2011) :
1)Promouvoir la maturation de cellules présentatrices d'antigènes (dont les CD) conjointement à leur chargement en antigènes tumoraux
2)Activer une (ou des) réponse(s) T favorable(s) à l'élimination de la tumeur
3)Surmonter l'immunosuppression du microenvironnement tumoral

Ces éléments peuvent être réunis en apportant un signal de danger fort au système immunitaire par une stratégie vaccinale adaptée. **La réponse obtenue dépendra en grande partie du type de stratégie et de son mode d'utilisation.**
Les lymphocytes T activés et spécifiques d'un ou plusieurs antigènes devront pénétrer dans le microenvironnement tumoral peu favorable au développement de la réponse T. Cette étape de la réponse anti-tumorale est actuellement le principal point critique, où de nombreuses approches d'immunothérapies échouent.

En effet, un pool important de cellules immunosuppressives dont les lymphocytes T_{Reg}, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ou encore les macrophages de type M2 (TAM2) infiltrent la tumeur et sont capables d'inhiber les fonctions effectrices des lymphocytes T ou des cellules *Natural Killer* (NK). Les cellules tumorales produisent également des molécules immunosuppressives (TGF-β, IL-10, IDO) ou expriment des molécules inhibitrices (PD-L1) favorisant l'anergie des LT, et peuvent induire la mort par apoptose des cellules T activés (Fas ligand) (Finn, 2008; Mellman et al., 2011). Par ailleurs, la néoangiogenèse tumorale anarchique a tendance à être délétère pour le système immunitaire et le VEGF sécrété par la tumeur bloque la maturation des cellules dendritiques et favorise l'expansion des lymphocytes T_{Reg}. Enfin, les cellules tumorales échappent à la surveillance du système immunitaire en diminuant l'expression de molécules du CMH I et ainsi la présentation d'antigènes (Campoli et al., 2002).

Nous ne ferons pas de revue exhaustive des mécanismes d'immunosuppression (voir revue (Rabinovich et al., 2007)) dont la diversité est telle qu'elle semble compromettre la réussite de l'immunothérapie anti-tumorale. Cependant, il est supposé qu'il existe un juste équilibre entre les différents protagonistes pro- et antitumoraux, l'objectif de l'immunothérapie étant de rompre cet équilibre en favorisant les réponses anti-tumorales (Figure 11).

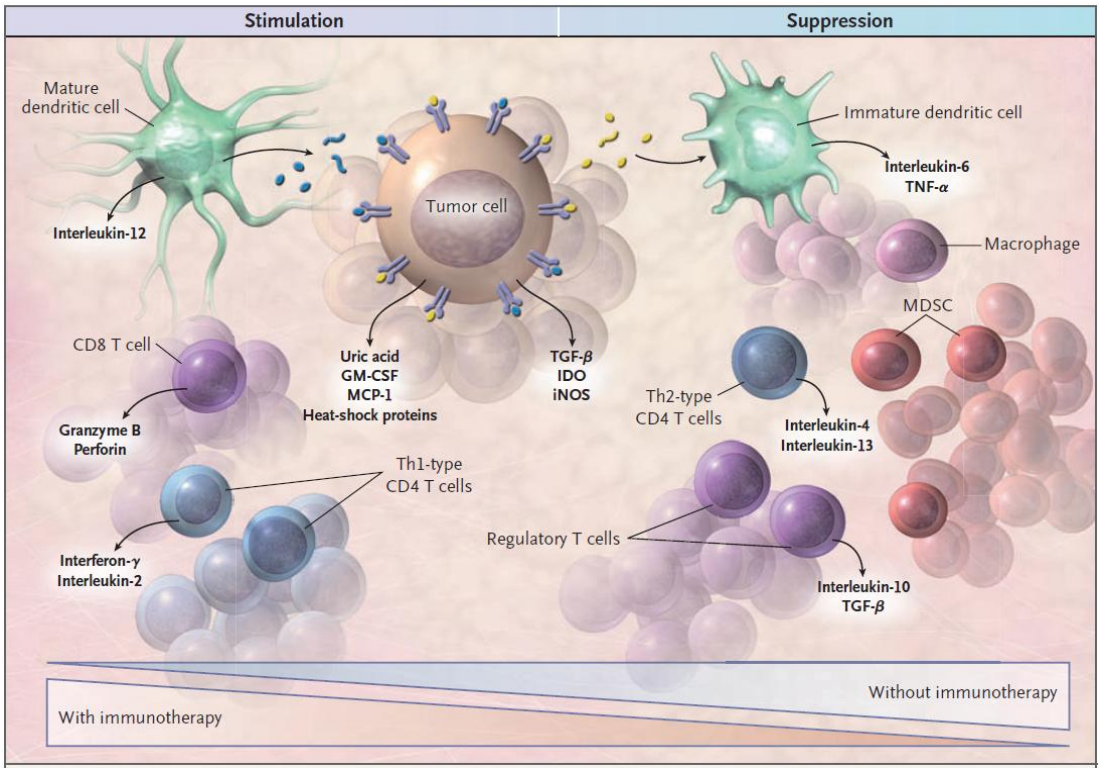


Figure 11: Forces immunostimulantes et immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral. (Finn, 2008). *GM-CSF granulocyte–macrophage colony-stimulating factor, IDO indolamine-2,3-dioxygenase, iNOS inducible, nitric oxide synthase, MCP-1 monocyte chemotactic protein 1, TGF-β transforming growth factor β.*

B. UN MESSAGE ANTIGÉNIQUE POUR L'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE

Un défi important pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique est de transmettre un message antigénique fort et de préférence spécifique de la tumeur. Cependant les antigènes associés aux tumeurs sont dans beaucoup de cas des protéines du soi, peu immunogènes, qui induisent une immunotolérance.

En pratique, toutes les protéines « nouvelles » (d'origine virale ou mutées), surexprimées ou anormalement exprimées par les cellules tumorales peuvent être des antigènes cibles pour l'immunothérapie. Dans cette partie, les différents messages antigéniques pouvant être délivrés au système immunitaire seront envisagés, puis nous reviendrons ensuite sur le choix de l'antigène « idéal ».

I. Antigènes multiples, non définis

L'essor des technologies de séquençage haut-débit a permis d'identifier plus de 400 gènes mutés dans un large panel de cancers. Il paraît donc pertinent d'utiliser des lysats totaux de cellules tumorales afin de n'exclure aucun antigène d'intérêt. L'injection de lysats tumoraux autologues (ou allogéniques) a été évaluée dans plusieurs essais cliniques et sur différents tissus tumoraux (cancers colorectaux, mélanomes...). Initialement, l'efficacité de cette stratégie a été entravée par l'immunotolérance établie vis-à-vis d'antigènes du soi présents dans la tumeur. Des travaux ont ensuite été menés pour casser cette tolérance, notamment en ajoutant des adjuvants pour stimuler le recrutement et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Buonaguro et al., 2011). On ne peut par contre s'absoudre d'un risque de réponse auto-immune.

II. Antigènes définis

Depuis la découverte de *MAGE-1*, le premier gène codant un antigène de tumeur humain reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques (van der Bruggen et al., 1991), plusieurs antigènes associés aux tumeurs ou spécifiques de la tumeur ont été identifiés et ont fait l'objet de multiples essais cliniques. Une classification des antigènes associés aux tumeurs a été établie par Novellino *et al.* en 2004 (toujours d'actualité) en fonction de leur restriction aux molécules du CMH (peptides épitopes présentés par le CMH II et le CMH I) et de leur

origine : 1) les antigènes associés aux tumeurs, retrouvés également sur les tissus sains, 2) Les antigènes spécifiques de tumeurs, absents des tissus sains (Novellino et al., 2005).

1. Les antigènes associés aux tumeurs, retrouvés de manière prédominante dans la tumeur ou surexprimés par rapport aux tissus sains

- Les *cancer/testis (C/T) antigens* ont été largement étudiés et testés en clinique, dans des vaccins antitumoraux, ces 20 dernières années. En tête de liste nous pouvons citer les antigènes *MAGE, BAGE et GAGE* ainsi que *NY-ESO-1*. Les *C/T antigens* sont exprimés dans les spermatocytes et plus rarement au niveau placentaire. L'expression tumorale résulte de la réactivation de gènes normalement « éteints » dans les tissus adultes. Le risque de réaction autoimmune à l'encontre des gamétocytes, dans le cadre d'immunothérapies avec ces antigènes, est faible, voire nul, car il s'agit d'un site immunoprivilégié (tolérance plus élevée du système immunitaire).

- Les antigènes de différenciation tissulaire sont exprimés principalement dans les mélanomes, les cancers de la prostate et du colon. Ces protéines sont retrouvées à la fois sur les cellules tumorales et le tissu sain adjacent, alors qu'elles sont absentes des autres tissus de l'organisme. C'est le cas des antigènes de différenciation des mélanocytes (MART1/melan-A, gp100 ou la tyrosinase), de la prostate (*prostate specific antigen*, PSA) ou du colon (*Carcinoma Embryonnary Antigen*, CEA). Malgré le risque de réactions contre les tissus sains, ces antigènes ont été et sont toujours exploités pour le développement de nouveaux vaccins antitumoraux.

- Les antigènes surexprimés par la tumeur sont les antigènes les plus largement répandus. On les retrouve globalement dans de nombreux types de cancers, sans expression préférentielle liée à un certain tissu tumoral, ainsi que dans les tissus sains, à des niveaux d'expression plus faibles. Il est souvent évoqué dans la littérature que l'expression ou la présentation de ces antigènes par le CMH du tissu sain est inférieure au seuil de reconnaissance par les cellules T. Inversement, dans les tissus tumoraux, un niveau d'expression et de présentation de l'antigène élevé favorise une réponse T. Parmi les antigènes surexprimés dans les tumeurs, les protéines anti-apoptotiques (*survivin, livin*), ou encore le facteur de croissance *HER-2/neu* ont fait l'objet de nombreuses études.

2. Les antigènes exprimés uniquement par la tumeur (Parmiani et al., 2007)

Ils peuvent être :

- Des protéines du soi résultant de mutations génétiques (p53 mutée ou Ras mutée). L'intérêt de cibler ce type d'antigènes est qu'ils sont à l'origine du développement tumoral car il s'agit d'oncogènes ; le risque d'échappement de la tumeur et d'immunosélection est donc absent si cette protéine joue un rôle crucial dans le maintien du statut tumoral.
- Des protéines virales issues de virus oncogènes type *Epstein Barr virus* ou *Human papilloma virus 16* et *18,* responsables de tumeurs viro-induites
- Des protéines de fusion, produits de translocations chromosomiques comme par exemple la translocation t(9 ;22) retrouvée dans la leucémie myéloïde chronique. Cette translocation entre les chromosomes 9 et 22 aboutit à la fusion des gènes *bcr* et *abl* qui est traduite en la protéine p210, une tyrosine kinase à activité augmentée.
- Des protéines dont les modifications post-traductionnelles sont altérées ; c'est le cas de la protéine MUC1 dont l'absence de glycosylation démasque un nouvel épitope. Ces antigènes sont regroupés actuellement dans une nouvelle classe d'antigènes : les « *tumor-associated carbohydrate antigens »* (TACAs). Ces antigènes sont peu immunogènes en raison de leur forte similarité avec les protéines normales. Plusieurs essais cliniques sont actuellement effectués en association à des adjuvants pour accroître leur immunogénicité.

Au jugé, le choix d'un antigène défini pour le développement d'une approche d'immunothérapie peut paraître délicat en raison des risques d'échappement de variants cellulaires n'exprimant pas ou ayant perdu l'expression de l'antigène. Il a en fait été démontré que suite à cette « première ligne » de traitement, d'autres antigènes tumoraux étaient relargués dans l'environnement et qu'une réponse immune cellulaire « de deuxième ligne » pouvait se développer, permettant ainsi d'amplifier le phénomène de lyse tumoral, même sur des cellules n'exprimant pas l'antigène ciblé initialement. Cette « dissémination d'épitope » (*Epitope spreading*) a été décrit initialement comme étant à l'origine de certaines maladies auto-immunes et plus récemment suite à une vaccination anti-tumorale (Ribas et al., 2003; Vanderlugt and Miller, 2002).

III. La quête du « bon message antigénique» (Cheever et al., 2009)

Une étude pilote réalisée en 2009 par le *National Cancer Institute* a proposé un classement de 75 antigènes de tumeurs, en fonction d'un score calculé sur 9 critères d'importance décroissante, permettant de définir l'antigène de tumeur idéal pour l'immunothérapie active spécifique. L'objectif de cette étude était de promouvoir la recherche translationnelle (chaînon manquant entre la recherche fondamentale et la recherche clinique) en aidant les investigateurs dans leur choix d'une cible adaptée. Un comité d'experts a été formé pour déterminer les critères et sous-critères ainsi que leur degré d'importance afin de leur attribuer un score pour le classement des antigènes. 4 critères majeurs ont été définis par les experts : 1. Une réponse clinique obtenue avec des approches ciblant l'antigène 2. L'immunogénicité (réponse cellulaire ou humorale spontanée ou obtenue lors d'essais cliniques) 3. L'oncogénicité (persistance de l'expression, rôle dans le processus tumoral) et 4. La spécificité (Tableau 1).

Les résultats de cette étude ont été tout d'abord analysés en prenant en compte les 9 critères, et les 75 antigènes ont été classés en fonction de leur score global (Figure 12). Les scores les plus élevés sont attribués majoritairement aux antigènes de tumeurs qui ont été testés en clinique à plusieurs reprises, avec des modalités vaccinales adaptées pour améliorer leur immunogénicité (WT1, MUC1, HPV E6 E7, NY-ESO-1…).

Dans une seconde analyse, plus adaptée à l'évaluation intrinsèque des antigènes, les auteurs ont effectué une classification en supprimant les facteurs d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité. En effet, ces deux critères sont potentiellement modulables, par la réalisation de nouveaux essais cliniques pour le premier, ou par une formulation ou des modalités vaccinales plus adaptées pour le second.

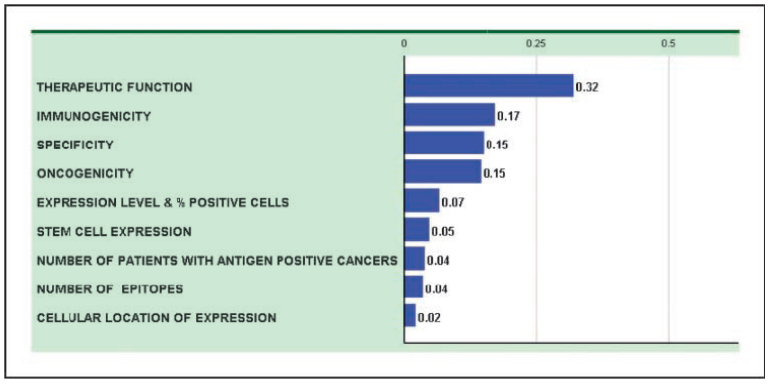


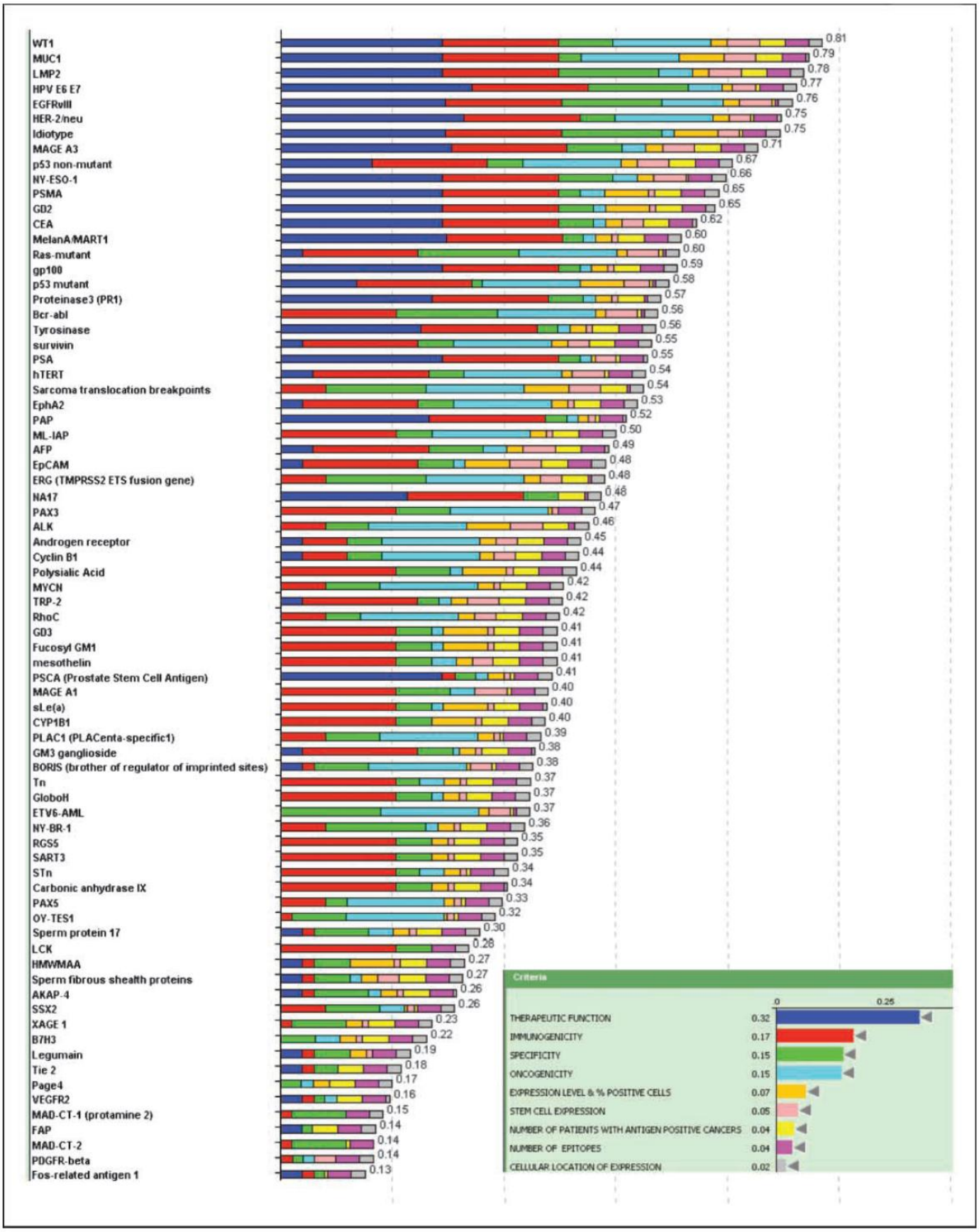
Tableau 1 : Importance relative des critères majeurs définissant un antigène de tumeur idéal (Cheever et al., 2009)

Par contre, les autres critères sont des critères biologiques qui ne peuvent être modifiés et qui définissent véritablement la « valeur » de l'antigène. La spécificité et l'oncogénicité ainsi que le niveau d'expression et le pourcentage de cellules exprimant l'antigène deviennent les critères majeurs de l'étude (Figure 13).

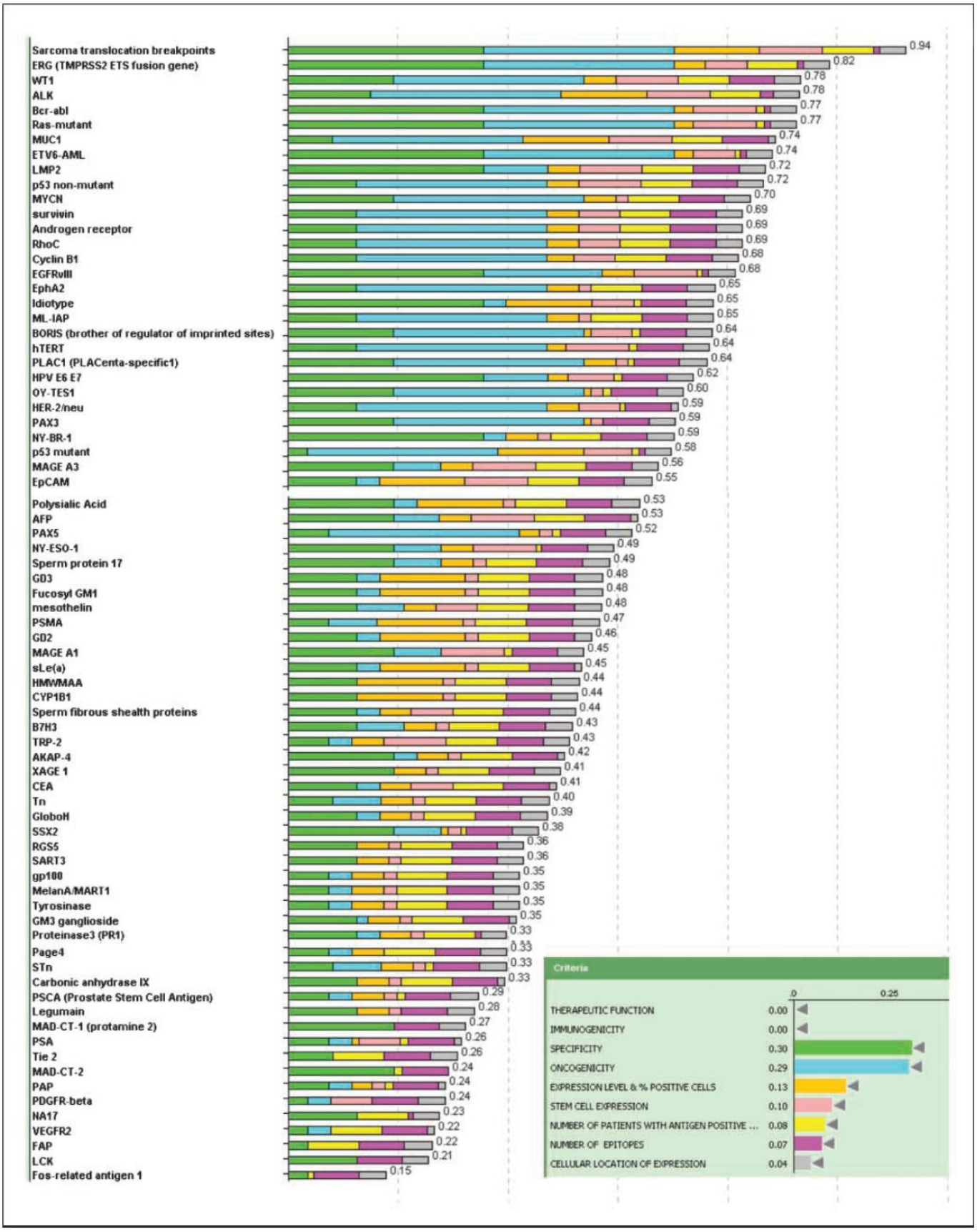
En résumé, aucun des antigènes identifiés ne répond parfaitement à la définition proposée de l'antigène de tumeur idéal. La plupart d'entre eux ne sont que d'une spécificité très relative (seulement 9 sur 75 obtiennent le score maximal pour le critère *spécificité*) et de nombreuses protéines oncogènes mutées ont une forte similarité avec les protéines non mutées exprimées par les tissus sains.

Selon cette analyse d'experts, un facteur conditionnant la réussite d'une immunothérapie anti-tumorale est le choix d'une cible antigénique exprimée exclusivement par la tumeur (spécificité) et nécessaire à sa survie (oncogénicité). Une expression forte et universelle de l'antigène (tous types de patients et éventuellement tous types de tumeurs) fait partie des critères de choix, l'immunogénicité étant un critère modulable.

Notons que la phosphatase acide prostatique (PAP), le seul antigène utilisé dans le cadre d'une immunothérapie active ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (sipuleucel-T, PROVENGE®), est classé en 69ème position sur 75 candidats en l'absence de prise en compte des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité.



<u>Figure 12</u> : Hiérarchisation des antigènes de tumeurs effectuée à partir des critères prédéfinis par les experts (Cheever et al., 2009).



<u>Figure 13</u> : Classification des antigènes de tumeurs après exclusion des critères d'efficacité thérapeutique et d'immunogénicité (Cheever et al., 2009).

C. STRATÉGIES D'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE ACTIVE SPECIFIQUE

En juin 2014, 250 essais cliniques sur tumeurs solides et pas loin de 40 autres dans le cadre de leucémies, lymphomes ou myélomes étaient référencés dans la base de données *« Cancer vaccines »* du *National Cancer Institute* (NCI) (Les différent essais cliniques, classés en fonction du type de cancers sont consultables sur cette page, rubrique 9. http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cancer-vaccines).

Une multitude d'approches ont été développées et consistent soit à administrer l'antigène associé à un adjuvant, soit à le charger *ex vivo* dans les cellules dendritiques puis réinjecter les CD au patient, soit vectoriser l'antigène *in vivo.* Nous n'avons pas pour ambition de décrire de manière exhaustive toutes ces approches, mais nous présenterons rapidement ces différentes classes et nous nous intéresserons plus particulièrement aux vecteurs bactériens.

I. Antigènes tumoraux non vectorisés

Suite à l'identification des antigènes de tumeurs, des « vaccins antitumoraux » comparables aux vaccins protéiques anti-infectieux (ex : antigène HBs de l'hépatite B) ont été développés. Cette stratégie combine l'injection de peptides ou de protéines antigéniques, simples ou associés à un ou des adjuvants capables d'activer les cellules présentatrices d'antigènes (GM-CSF, IL-12, IFN-α, CpG...). Des réponses partielles ou complètes ont été obtenues chez quelques patients avec une réponse lymphocytaire T spécifique, mais l'efficacité de ce type de vaccin reste très inconstante. Par ailleurs se pose le problème de la délivrance de l'antigène, dont la présentation par le CMH I n'est pas favorisée par ce type d'administration, hormis dans le cas de la cross-présentation.

Plusieurs essais de phase II et III sont actuellement effectués avec des peptides ou des protéines recombinantes couplés à des cytokines (GM-CSF) ou à des ligands des TLRs.

L'immunogénicité des protéines ou peptides antigéniques peut être améliorée par l'utilisation des *Heat Shock Proteins* (HSPs), protéines chaperonnes présentes dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes. En conditions physiologiques, elles aident au repliement des protéines et au transport intracellulaire des peptides. Dans le cas d'un stress, d'un choc thermique, d'une inflammation ou encore dans les cellules tumorales, l'expression des HSPs peut être dérégulée. Il a été démontré que l'utilisation des HSPs purifiées d'une tumeur pouvait entraîner une réponse contre cette tumeur lorsqu'elles étaient réinjectées. Couplées à des

antigènes de tumeurs elles permettent de générer une réponse T CD8+ spécifique des peptides tumoraux. Par ailleurs elles activeraient l'immunité innée par leur fixation aux TLRs, leur conférant des propriétés uniques pour l'immunothérapie anti-tumorale (Asea et al., 2002; Srivastava and Amato, 2001).

II. Cellules dendritiques chargées en antigènes *ex vivo* puis réinjectées

La cellule dendritique étant au centre de la réponse immune spécifique, les immunothérapeutes ont rapidement pensé à les utiliser pour obtenir une réponse anti-tumorale. Plusieurs moyens ont été développés pour produire les CD à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) obtenues par leucophérèse (séparation des globules blancs du sang). La méthode employée couramment consiste à différencier les PBMC en CD par l'utilisation de cytokines (GM-CSF, IL-4) puis à charger ces cellules en antigènes de tumeur soit par :

- Transfection ou transduction de l'ADN ou l'ARNm codant l'antigène
- Incubation avec une solution d'antigènes (phagocytés par les CD)

La maturation des CD est effectuée de différentes manières (selon la recette du laboratoire) mais on retrouve généralement l'utilisation de LPS, GM-CSF, CD40L… Une fois les cellules dendritiques « éduquées », elles sont réinjectées au patient de manière répétée pour présenter les peptides épitopes via les molécules du CMH I ou II et stimuler les LT naïfs du receveur (Figure 14).

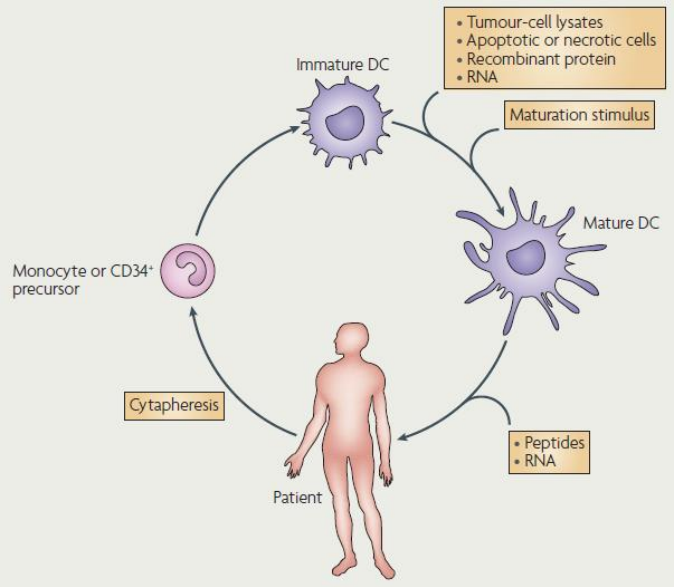


Figure 14 : Approche vaccinale basée sur l'éducation *ex vivo* des cellules dendritiques puis la réinjection afin d'induire l'immunité anti-tumorale (Tacken et al., 2007).

Sipuleucel-T (Provenge®) utilise par exemple des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) autologues chargées *ex vivo* par la protéine recombinante phosphatase acide prostatique (PAP)-GM-CSF (Cheever and Higano, 2011).

De nombreux essais cliniques de phase II et III reprenant cette stratégie sont en cours sur différentes tumeurs solides ; ces essais ont donné des résultats intéressants, notamment pour DCVax®-Brain (Northwest Biotherapeutics) qui est en phase III d'études cliniques pour le traitement du glioblastome multiforme. La voie ouverte par l'AMM du sipuleucel-T va certainement faciliter l'accès au marché de ce nouveau type de thérapies.

Néanmoins le procédé de préparation est extrêmement lourd, car il s'agit d'une immunothérapie personnalisée qui nécessite au préalable un prélèvement de leucocytes autologues ; cela se répercute sur le coût du traitement (dans le cas du sipuleucel-T, le traitement consiste en 3 injections = 70 000€).

III. Utilisation de vecteurs

L'évolution des connaissances en microbiologie et en virologie a permis le « détournement » des mécanismes infectieux d'agents pathogènes pour le développement de l'immunothérapie. Différentes formes de vecteurs, injectés *in vivo*, capables de délivrer les antigènes tumoraux dans le compartiment cellulaire adapté, et de stimuler l'immunité innée par le signal de danger qu'ils apportent, ont été élaborés.

1. Vecteurs plasmidiques (ADN nu)(Fioretti et al., 2013)

Il s'agit de plasmides bactériens modifiés contenant l'ADNc d'un ou plusieurs antigène(s) de tumeur à cibler. La transcription du gène d'intérêt est sous le contrôle de promoteurs actifs dans les cellules mammifères (Anderson and Schneider, 2007). L'administration d'ADN nu est généralement associée à des adjuvants divers pour augmenter l'immunogénicité du vaccin. L'ADN codant une ou plusieurs cytokines est parfois intégré directement au vecteur plasmidique (GM-CSF, IL-12). Le mode d'administration est variable selon les technologies développées, mais l'administration intramusculaire suivie d'une électroporation au site d'injection semble donner des résultats prometteurs dans deux études de phase II dirigée contre les antigènes E6 et E7 de HPV 16 et/ou 18, et contre l'antigène WT1 (INOVIO Pharmaceuticals).

2. Vecteurs protéiques

L'antigène est fusionné à une protéine (toxines principalement) permettant sa délivrance dans le cytoplasme des cellules présentatrices d'antigène. L'adressage au CPAg est effectué par une intéraction toxine/recepteur déclenchant soit son internalisation par endocytose puis sa libération intracytoplasmique (*Shiga toxin* (sous-unité STxB non toxique et récepteur glycolipidique Gb3) de *Shigella* (Haicheur et al., 2000)*)* soit sa translocation directe dans le compartiment intracellulaire (adénylate cyclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* et récepteur aux intégrines $\alpha_M\beta_2$ (Préville et al., 2005)).

L'injection de la protéine de fusion CyaA-E7 (protéine E7 de l'*human papilloma virus* (HPV) 16) aux souris, sans ajout d'adjuvant, entraîne l'apparition d'une réponse CTL mais également d'une réponse CD4+ de type Th1 spécifique de E7, et l'élimination d'une tumeur exprimant artificiellement l'antigène (Berraondo et al., 2007; Préville et al., 2005). De même, l'injection d'une protéine de fusion STxB-OVA ou STxB-E7 permet l'apparition de lymphocytes T CD8+ spécifiques, mais aussi une orientation Th1 de la réponse immune, associée à un effet antitumoral prophylactique et curatif contre une tumeur exprimant artificiellement l'antigène (Vingert et al., 2006).

La société Genticel développe actuellement, en phase 2 d'étude clinique, un vaccin bivalent (ProCervix®) dirigé contre la protéine E7 de HPV 16 et/ou HPV 18 à partir du vecteur protéique CyaA pour le traitement des cancers du col de l'utérus HPV16+ et/ou HPV18+.

3. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules composées d'une partie interne aqueuse et d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques externes. L'encapsulation en liposomes de peptides antigéniques est une stratégie permettant la délivrance directement dans le compartiment intracellulaire des cellules présentatrices d'antigènes (présentation aux lymphocytes T par le CMH I). Les résultats d'une étude clinique de phase III (Stimuvax®, BLP25) ont été publiés fin 2012 et ne montrent pas d'amélioration de la survie globale des patients traités (Kroemer et al., 2013).

4. Vecteurs viraux

Les virus recombinants non réplicatifs peuvent infecter les cellules de l'organisme et utiliser la machinerie cellulaire pour produire des antigènes de tumeur. Ces vecteurs sont particulièrement intéressants car ils vont favoriser la présentation des antigènes produits par le CMH I, mimant la présentation des antigènes lors d'une infection virale naturelle. L'activation des PRRs intracellulaires va en plus faciliter la maturation de la cellule présentatrice d'antigène infectée. La sécurité des vecteurs viraux a été fortement améliorée ces dernières années et l'utilisation de virus non réplicatifs ayant un tropisme pour les cellules présentatrices d'antigène limite les risques d'intégration génomique non spécifique. Plusieurs types de virus sont étudiés en phase clinique (*adenovirus*, *herpesvirus*, *poxvirus*), les plus couramment retrouvés étant les *poxvirus*.

PROSTVAC® -VF TRICOM™, un virus de la vaccine recombinant contenant l'ADN codant la PSA (*Prostate-Specific Antigen*) et 3 molécules de co-stimulation (B7-1, LFA-3 et ICAM-1), est en étude clinique de phase III en association avec GM-CSF dans le cancer de la prostate (Madan et al., 2012).

L'entreprise française Transgene fait figure de leader dans ce domaine avec un virus de la vaccine recombinant contenant une séquence codant l'antigène MUC1 en association avec l'IL-2 en traitement du cancer des poumons non à petites cellules.

Un inconvénient que peut présenter cette approche est la présence fréquente d'une réponse immune neutralisant le vecteur viral, particulièrement dans le cas des *herpesvirus* et *adenovirus* où les patients ont déjà développée une immunité anti-vecteur. L'intérêt des poxvirus et que, hormis une infection ancienne par le virus de la vaccine (vaccin *smallpox*), les patients n'ont jamais été exposé à ce type de virus (Cawood et al., 2012).

5. Vecteurs bactériens

Les travaux pionniers du chirurgien William Coley ont permis de démontrer que les bactéries pouvaient induire une forte réponse des cellules de l'immunité innée dans la tumeur, en raison des nombreux PAMPs qu'elles expriment. Cette capacité de la bactérie à surmonter la tolérance associée aux tumeurs a conduit au développement de plusieurs vecteurs bactériens pour l'immunothérapie dont *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Streptococcus* et plus récemment *Pseudomonas*.

L'idée initiale était d'injecter **directement la bactérie dans la tumeur**, ou d'utiliser des bactéries anaérobies facultatives ayant un tropisme pour les tumeurs hypoxiques (comme

Salmonella ou *Escherichia*). La toxicité naturelle des bactéries envers les cellules tumorales ainsi que l'activation locale d'une réponse immunitaire permettaient de faire régresser la tumeur et d'améliorer la survie chez la souris. Certaines espèces bactériennes ont été modifiées pour exprimer des cytokines pro-inflammatoires ou encore des prodrogues cytotoxiques activables dans la tumeur, améliorant encore la réponse anti-tumorale. De nombreux essais cliniques et précliniques ont été effectués avec *Salmonella* et *Clostridium*, mais la toxicité intrinsèque des bactéries et leur spécificité fluctuante pour la tumeur sont des variables qui limitent le développement de cette approche (Forbes, 2010).

Une stratégie alternative a été de produire des bactéries vectrices, capables d'induire une forte réponse innée et de délivrer également un « message antigénique » au système immunitaire. La découverte des facteurs de virulence permettant l'injection intracytoplasmique de toxines (système de sécrétion de type III de bactéries Gram négatif) ou la libération intracellulaire du contenu phagosomal (listeriolysine de *Listeria*) a ouvert la voie à de nouvelles méthodes de délivrance intracellulaire d'antigènes aux CPAg (Paterson et al., 2010). *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica serovar typhimurium* sont actuellement les vecteurs les plus avancés dans ce domaine et font l'objet d'études cliniques. Une revue de la littérature et un commentaire (en annexe du manuscrit) ont été récemment publiés par notre laboratoire sur ces nouveaux vecteurs bactériens pour l'immunothérapie anti-tumorale (Le Gouëllec et al., 2012; Toussaint et al., 2013).

- ***Listeria monocytogenes* et listeriolysine**

L. monocytogenes est une bactérie Gram positif intracellulaire facultative capable d'éviter la bactéricidie mise en place par les macrophages et les polynucléaires. Cet échappement est dû à la sécrétion par la bactérie de la listeriolysine (LLO), une toxine qui provoque la rupture de la membrane lysosomale (Birmingham et al., 2008) et qui libère les bactéries dans le cytoplasme des cellules phagocytaires. Ces modifications du compartiment lysosomal par la bactérie génèrent la sécrétion de chimiokines ou de cytokines inflammatoires par les cellules hôtes et vont favoriser le recrutement de cellules au site de l'infection. Par ailleurs, de nombreux PAMPs sont exprimés par *Listeria* (dont la listeriolysine) et vont stimuler les PRRs intracellulaires. Cette cascade de réaction va promouvoir le développement d'une réponse cytotoxique et d'une réponse CD4+ de type Th1 (Rothman and Paterson, 2013).

Une fois dans le cytoplasme la bactérie acquiert une motilité par l'expression de la protéine ActA qui se lie à l'actine de la cellule hôte et active sa polymérisation. Cette fonction lui

permet de se déplacer jusqu'à la membrane cellulaire et de sortir de la cellule hôte pour être phagocytée par d'autres cellules.

Ainsi les protéines sécrétées par la bactérie dans le cytoplasme des cellules phagocytaires tels que les facteurs de virulence ActA et LLO peuvent être traités de manière identique aux protéines endogènes. Les peptides issus de leur dégradation vont alors être présentés par la voie du CMH I. Cette voie de présentation particulière a été exploitée pour le développement d'une bactérie *L.monocytogenes* atténuée exprimant la listeriolysine ou la protéine ActA fusionnée à un antigène de tumeur pour générer une réponse T CD8+ spécifique de l'antigène (Paterson et al., 2010). L'utilisation de la bactérie en immunothérapie anti-tumorale a montré son intérêt chez la souris et l'homme à de multiples reprises et des réponses de types CD4+ Th1 et CTLs spécifique de l'antigène ont été décrites (Toussaint et al., 2013). Actuellement, plusieurs essais cliniques de phase I et II évaluent l'efficacité du vecteur bactérien *Listeria monocytogenes* atténué dans le traitement des cancers HPV-induits, du cancer du pancréas, du mésothéliome malin et des astrocytomes (Tableau 2).

Formulation	Antigène(s) ciblé(s)	Description	Indication(s)	Développement clinique	Investigateur(s)
Bactérie atténuée *Listeria monocytogenes*	HPV E7	Administration répétée de *Listeria* atténuée exprimant l'antigène E7 de HPV (ADXS11-001)	Cancer du col avancé et/ou récurrent HPV-induit	ADXS11-001 **phase II**	ADVAXIS http://www.advaxis.com
Bactérie atténuée *Listeria monocytogenes*	HPV E7	Administration répétée de *Listeria* atténuée exprimant l'antigène E7 de HPV (ADXS11-001)+ cures de chimiothérapie et de radiothérapie	Cancer de l'anus HPV-induit	ADXS11-001+chimiothérapie+ radiothérapie **phase I/II**	
Bactérie atténuée *Listeria monocytogenes* couplée à GVAX	mesothelin	Administration séquentielle de *Listeria* atténuée exprimant la mésothelin (CRS-207) et de cellules tumorales pancréatiques irradiées sécrétant du GM-CSF (GVAX)	Cancer du pancréas	CRS-207+GVAX **phase II**	ADURO BIOTECH http://www.adurobiotech.com
Bactérie atténuée *Listeria monocytogenes*	mesothelin	Administration séquentielle de *Listeria* atténuée exprimant la mésothelin (CRS-207) + cures de chimiothérapie	Mésotheliome pleural malin	CRS-207+chimiothérapie **phase Ib**	
Bactérie atténuée *Listeria monocytogenes (ΔactA/ΔinlB)*	EGFRvIII et NY-ESO-1	Administration de 4 doses (intervalle de 21 jours entre chaque dose) de *Listeria* atténuée exprimant les antigènes EGFRvIII et NY-ESO-1 (ADU-623) suivi de l'administration de 3 jours d'antibiotiques après chaque dose	Astrocytomes de grade III ou IV	ADU-623 **phase I**	

Tableau 2 : Immunothérapies anti-tumorales active et spécifiques par vecteurs bactériens atténués en études cliniques (recueil effectué à partir de la base de données d'essais cliniques du *National Institute of Health ; clinicaltrial.gov*).

- ***Salmonella enterica serovar typhimurium* et système de sécrétion de type III (SST3)**

Salmonella est une bactérie Gram négatif anaérobie et intracellulaire facultative qui infecte l'homme et l'animal par voie orale. Contrairement à *Listeria,* la bactérie ne possède pas de mécanismes d'échappement du phagolysosome, mais exprime un certains nombre de facteurs de virulence qui permettent la persistance de la bactérie dans ce compartiment.

Le SST3 fait partie de ces mécanismes de virulence et est caractérisé chez les genres *Salmonella*, *Yersinia, Shigella* et *Pseudomonas* (*cf.* ci-dessous pour de plus amples détails sur le SST3). Il s'agit d'un facteur de virulence majeur, souvent comparé à une seringue, qui permet d'injecter des exotoxines spécifiques directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. L'activation du SST3 est induite lors d'un contact avec une cellule eucaryote, permettant l'injection des effecteurs qui possèdent une séquence signal de reconnaissance du SST3 (Figure 15). La bactérie *Salmonella* peut soit injecter les effecteurs lorsqu'elle se trouve dans l'environnement extracellulaire (*Salmonella pathogenicity island 1*) ou lorsqu'elle est localisée dans le phagolysosome (*Salmonella pathogenicity island 2*) (Figure 15).

Lorsqu'un antigène d'intérêt ou une protéine est associée à la séquence signal permettant le passage des toxines à travers le SST3, la protéine de fusion est également injectée et délivrée dans le cytoplasme des cellules cibles, notamment les cellules phagocytaires, recrutées par chimiotactisme au site inflammatoire (Hegazy et al., 2012).

Rüssmann *et al.* ont démontré que cette voie d'injection pouvait être utilisée pour délivrer des protéines antigéniques présentées par le CMH I des cellules hôtes et induire une réponse T protectrice (Rüssmann et al., 1998). A la suite de ce travail, de nombreuses études ont été effectuées et ont démontré que ce type de vectorisation permettait de générer *in vivo* à la fois une réponse T CD8+ et T CD4+ spécifique de l'antigène de tumeur et une réponse clinique efficace chez la souris (Nishikawa et al., 2006, 2008; Toussaint et al., 2013).

Malgré le foisonnement d'études précliniques ayant testé et montré l'efficacité du vecteur *Salmonella* dans des applications variées, peu d'études cliniques ont été réalisées jusqu'à présent (Shahabi et al., 2010).

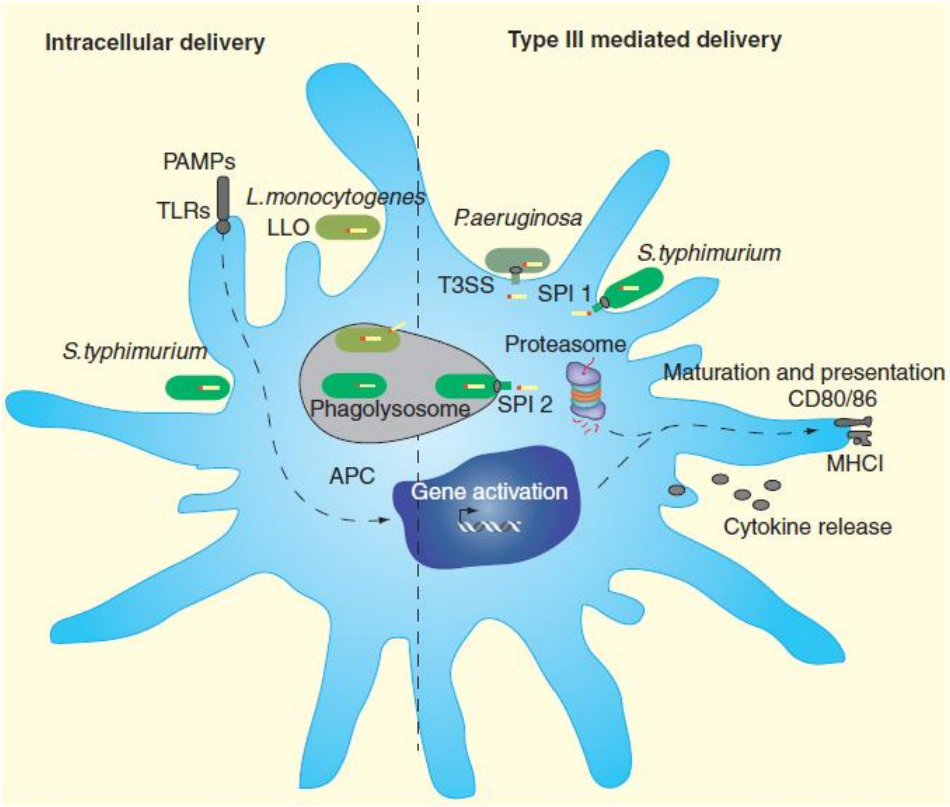


Figure 15 : Méthodes de délivrance intracellulaire d'antigènes par différents vecteurs bactériens génétiquement modifiés. *APC: Antigen presenting cell; LLO: Lysteriolysin; PAMPs: Pathogen associated molecular patterns; SPI: Salmonella pathogenicity island; TLR: Toll like receptor; T3SS: Type 3 secretion* system (Toussaint et al., 2013)

Le laboratoire TIMC-IMAG équipe TheREx a mis au point un vecteur bactérien, à partir d'une souche atténuée de *Pseudomonas aeruginosa*, technologie dénommée BacVac (*Bacterial Vaccine*), dont le SST3 est asservit pour délivrer des antigènes de tumeur au système immunitaire *in vivo* (Epaulard et al., 2006).

Ce vecteur bactérien a donné des résultats encourageants en modèle préclinique murin de mélanome et de glioblastome.

D. IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE SPÉCIFIQUE ET *Pseudomonas aeruginosa*

I. *Pseudomonas aeruginosa* : un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomial es

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif de l'environnement. Il s'agit d'une bactérie dont le pouvoir pathogène s'exprime dans des situations bien particulières : la mucoviscidose, l'immunodépression, les infections nosocomiales (3ème agent après *Staphylococcus aureus* et *E. coli*) (chirurgie, réanimation, grand brûlés…), etc... Chez les patients immunocompétents, la bactérie est source d'infections bénignes le plus souvent (otites, folliculites, endophtalmies liées au port de lentilles de contact souples…), grâce aux barrières physiques (peau, muqueuses,…) mais aussi à la présence d'une immunité innée et adaptative fonctionnelle. *P. aeruginosa* devient un pathogène puissant lors d'une infection notamment parce qu'il est doté de nombreux facteurs de virulence : lipopolysaccharides (LPS), exotoxine A, protéases (élastases, collagénase) et phospholipases ainsi que diverses toxines sécrétées par plusieurs systèmes de sécrétion dont le système de sécrétion le type III (SST3). Plusieurs études décrivent le SST3 comme élément primordial de la virulence aiguë de la bactérie (Hauser, 2009).

II. Système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* : structure, fonction et régulation

Les bactéries Gram négatif possèdent jusqu'à 6 systèmes de sécrétion différents qui participent au transport de différentes protéines au travers de la membrane bactérienne. Nous nous limiterons ici à la description du SST3 dont la particularité est d'injecter des protéines, plus précisément des exotoxines, directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Galán and Wolf-Watz, 2006; Galle et al., 2012a; Hauser, 2009).

1. Structure du SST3 de *P. aeruginosa*

Le SST3 de *P. aeruginosa* est un complexe macromoléculaire constitué de plus de 20 protéines (Galle et al., 2012a), dont la synthèse est sous la dépendance du facteur de transcription ExsA (Brutinel et al., 2008; Frank and Iglewski, 1991), et qui traverse à la fois la membrane bactérienne interne, l'espace périplasmique, la couche de peptidoglycane, la

membrane bactérienne externe, l'espace extracellulaire pour s'enchâsser enfin dans la membrane de la cellule hôte (Figure 16). D'un point de vue fonctionnel, le SST3 est composé d'un appareil de sécrétion (injectisome ou complexe « aiguille »), d'un appareil de translocation, de protéines effectrices sécrétées (exotoxines) et de protéines chaperonnes apparentées (Galle et al., 2012a). L'appareil de sécrétion est composé d'une première partie en forme d'anneau insérée dans la membrane interne bactérienne, constituée par les protéines PscD, PscR, PscS, PscT, PscT, PscU et PscV, puis d'un second élément, formé d'oligomères de PscC, inséré dans la membrane externe bactérienne.

L'appareil de translocation est constitué d'un polymère de PsCF se terminant par la protéine PcrV. Lors du contact bactérie-cellule, deux protéines, PopB et PopD sont transportées depuis le cytoplasme bactérien jusqu'au niveau de la membrane cellulaire pour s'y insérer et former un pore indispensable à la translocation des toxines dans le cytoplasme de la cellule eucaryote (Figure 16).

L'activation naturelle du SST3 se fait au contact des cellules hôtes, principalement les cellules de l'immunité et les cellules épithéliales. Cependant le mécanisme exact de signalisation permettant l'expression du SST3 n'est pas connu (Galle et al., 2012).

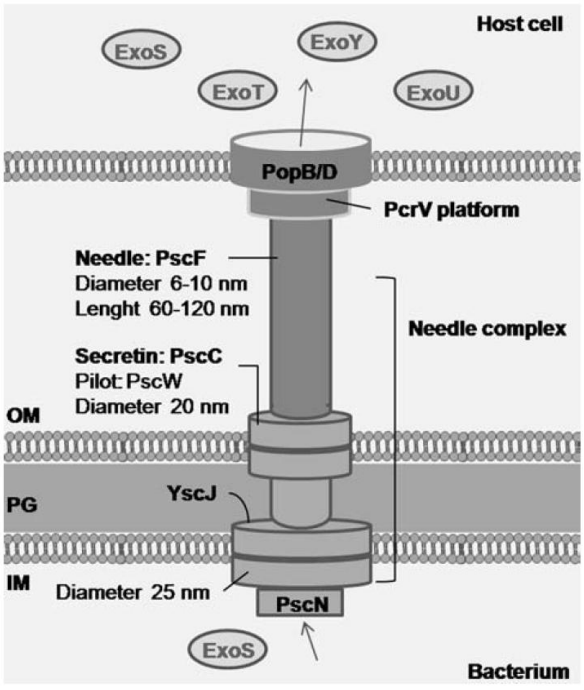


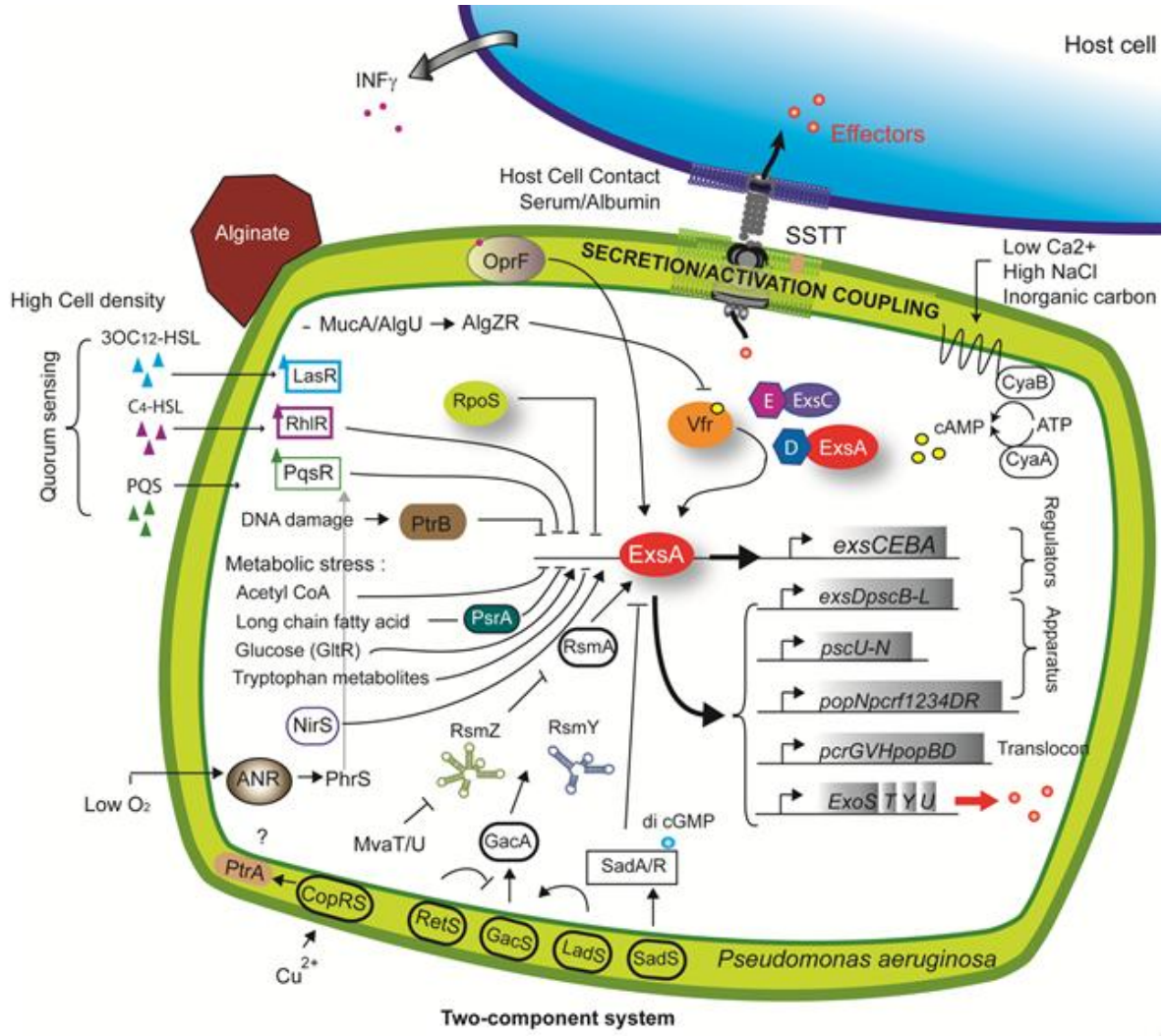
Figure 16 : Structure du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. Le SST3 s'apparente à une « seringue » traversant les deux membranes bactériennes, capable de s'enchâsser dans la membrane de la cellule eucaryote cible pour y injecter des toxines directement dans le cytoplasme. Ce processus est facilité par l'intervention de protéines chaperonnes et différentes protéines régulatrices. OM : *outside membrane* ; IM : *inner membrane ;* PG : *peptidoglycan*

Quatre toxines sont connues pour être sécrétées par le SST3 : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY.
ExoS et ExoT sont des enzymes à activité GTPase et ADP-ribosyltransferase sur des petites protéines G de la famille Rho. Elles entraînent différentes perturbations du fonctionnement cellulaire, dont l'échappement à la phagocytose (destruction du cytosquelette) et l'induction de la mort cellulaire (Frithz-Lindsten et al., 1997). Des travaux menés précédemment au laboratoire ont permis d'identifier les 54 acides aminés en N-terminal d'ExoS nécessaires à la sécrétion et à la translocation de la toxine (Epaulard et al., 2006).
ExoS peut également interagir avec les lymphocytes T et les monocytes lorsqu'elle se trouve dans l'espace extracellulaire (0,1% des exotoxines échappent à l'injection et se retrouvent dans l'espace extracellulaire) et entraîner l'apoptose des lymphocytes T et la production de cytokines et chemokines pro-inflammatoires par les monocytes, faisant intervenir l'activation des TLRs 2 et 4 (Bruno et al., 2000; Epelman et al., 2000, 2002).
ExoU est une phospholipase dont l'action s'exerce principalement sur les membranes cellulaires, induisant une nécrose puis la lyse de la cellule cible. Cette toxine n'est pas toujours exprimée par *P. aeruginosa* (Finck-Barbançon et al., 1997). En l'occurrence, la souche CHA utilisée au laboratoire n'exprime pas cette toxine et bénéficie d'une toxicité réduite (Dacheux et al., 1999).
ExoY est une adénylate cyclase relativement bien conservée dans les différentes souches de *P. aeruginosa* et ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans l'infection (Vance et al., 2005).
Les protéines PopB et PopD participent à l'ancrage du SST3 à la cellule eucaryote et à la translocation des protéines en formant un pore dans la membrane cellulaire. Une toxicité « pore-forming » (*in vitro*) est d'ailleurs attribuée au complexe PopB/PopD (Dacheux et al., 2001). Lors de l'activation artificielle du SST3 par déplétion calcique, elles sont relarguées dans le milieu, de la même manière que les exotoxines.
Des chaperonnes du SST3 sont également décrites et interviennent lors de l'assemblage du complexe et de la sécrétion des exotoxines, mais ne sont jamais injectées au travers du SST3 (Galle et al., 2012a).

2. Régulation du SST3 de *P. aeruginosa*

Le SST3 est un système hautement régulé qui est activé *in vivo* lors de la phase aiguë de l'infection (Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint, 2012) (Figure 17). La translocation des protéines est provoquée par le contact cellules-bactéries et la sécrétion est

déclenchée *in vitro* par une déplétion calcique que l'on peut induire artificiellement en présence d'un chélateur du calcium (EGTA), ce qui permet des études fonctionnelles. La présence de sérum dans le milieu de culture semble aussi être un facteur activant le SST3 (Hueck, 1998). La genèse du SST3 ainsi que la translocation des protéines effectrices sont dépendantes d'environ 36 gènes du génome de *P. aeruginosa* (Frank, 1997). L'ensemble de ces gènes sont sous la stricte dépendance d'un activateur transcriptionnel : la protéine ExsA (Brutinel et al., 2008). ExsA se fixe directement sur le promoteur des gènes du SST3 mais également sur son propre promoteur (Brutinel et al., 2008). Il s'agit d'un système très complexe de régulation à plusieurs composantes (ExsC, ExsD et ExsE), jouant principalement sur l'inhibition d'ExsA, qui n'est libéré que dans les conditions citées précédemment (déplétion calcique ou contact cellulaire) (Galle et al., 2012a; Hovey and Frank, 1995).



<u>Figure 17</u> : Schéma de la régulation du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. (Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint, 2012)

3. Fonction du SST3 de *P. aeruginosa*

Il est démontré que le SST3 de *P. aeruginosa* est un facteur de virulence majeur de la bactérie à l'origine d'une importante cytotoxicité envers les cellules de l'hôte, en particulier dans l'induction de la nécrose et de l'apoptose de diverses populations cellulaires, et contribue à altérer les fonctions des phagocytes (Hauser and Engel, 1999; Kang et al., 1997). Les cellules cibles du SST3 sont principalement les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires et les cellules épithéliales. La cytotoxicité envers les polynucléaires et les macrophages est clairement dépendante de l'activation du SST3 (Dacheux et al., 1999, 2000). Le contact entre les cellules et la bactérie active le SST3 et entraîne la libération des exotoxines ExoU, ExoS et ExoT dans la cellule. La contribution de ces 3 exotoxines dans la mortalité, la persistance des bactéries dans les poumons, et la dissémination des bactéries a été évaluée dans des modèles de pneumonie aiguë chez la souris et le lapin (Feltman et al., 2001). Il semble que l'exotoxine ExoU ait le plus grand impact, d'après des études de toxicité *in vitro* (Finck-Barbançon et al., 1997; Hauser and Engel, 1999). Hormis ce rôle de transport des protéines effectrices, l'insertion du SST3 dans la membrane des cellules hôtes semble contribuer à la cytotoxicité, notamment par l'activation de la caspase-1 capable d'induire la mort cellulaire par pyroptose (Galle et al., 2012b), mais également via une toxicité « *pore-forming* » (*in vitro*) liée au complexe PopB/PopD décrit ci-dessus.

La connaissance précise du mode de vie de *P. aeruginosa* permet d'exploiter ses mécanismes infectieux, notamment le SST3, pour en faire un outil de vectorisation à but thérapeutique. La modification de la bactérie fait appel à différentes techniques de génie génétique pour asservir son SST3.

III. *P. aeruginosa* comme vecteur de protéines d'intérêt thérapeutique

1. Historique

La souche clinique mucoïde de *P. aeruginosa* CHA, issu d'un prélèvement sur un patient atteint de mucoviscidose au CHU de Grenoble, a été caractérisée par l'absence du gène *exoU* et ainsi par une toxicité naturellement réduite (Dacheux et al., 1999). Polack *et al*. ont mis au point, à partir de cette souche naturellement atténuée, une stratégie de thérapie cellulaire par livraison de protéines thérapeutiques directement dans le compartiment intracellulaire des cellules cibles (complémentation enzymatique). Cette approche avait pour objectif de

restaurer l'activité de la NADPH oxidase, un complexe enzymatique membranaire, en délivrant la protéine cytosolique $p67^{phox}$ nécessaire à l'activité du complexe. L'idée était donc de tester la capacité de la souche *P. aeruginosa* à rétablir la fonctionnalité du complexe en délivrant la protéine $p67^{phox}$ dans des cellules déficientes. En couplant l'exotoxine ExoS (les premiers 129 AA ainsi que la protéine chaperonnes Orf1) à la protéine $p67^{phox}$, Polack *et al.* ont démontré qu'ils étaient capables de faire synthétiser cette protéine de fusion fonctionnelle à la bactérie et de l'injecter dans le cytoplasme des cellules cibles via le SST3. Enfin, l'injection de la protéine dans les cellules déficientes pour la NADPH oxidase était capable de rétablir l'activité de l'enzyme (Polack et al., 2000).

Suite à ce travail, une souche atténuée (délétée des exotoxines ExoS et ExoT et de la protéine chaperonne Orf1) a été élaborée pour produire et délivrer des protéines au travers du SST3. Une séquence minimale d'adressage des protéines au SST3 a été identifiée : il s'agit des 54 premiers acides aminés N-terminaux de la protéine ExoS (ExoS54) (Brevet WO2005/049644A2), qui sont fusionnés dans une construction plasmidique à l'ADN codant la protéine d'intérêt (Quénée, 2004).

2. Asservissement du SST3 de *P. aeruginosa*

La sécrétion *in vitro* et la translocation *in vivo* d'une protéine antigénique sont rendues possibles grâce au plasmide pEAi3S54 (GenBank: JQ733380.1) (Figure 18). Cette construction plasmidique a été mise au point en plaçant l'activateur transcriptionnel ExsA sous la dépendance d'un promoteur inductible (p*taq*). En condition non-induite p*taq* est couplé au répresseur $LacI^Q$ et la transcription d'*exsA* est inhibée. En présence d'un ligand de $LacI^Q$ (lactose, IPTG) (1), l'inhibition de p*taq* est levée (2) et la transcription du gène *exsA* peut avoir lieu (3). ExsA va se fixer au promoteur des différents gènes du SST3 (4) et permettre son assemblage ainsi que la production des exotoxines non délétées (5). Enfin la protéine de fusion ExoS54-protéine d'intérêt (séquence clonée en aval de la séquence codant ExoS54) est produite (7) après fixation d'ExsA sur le promoteur d'ExoS (6) (Figure 18)(Filopon et al., 2006).

Suite à la transformation de la souche *P. aeruginosa* CHAΔ*exoSexoTorf1* (OST) par cette construction plasmidique, Filopon *et al.* ont montré que l'addition d'IPTG au milieu de culture induisait la transcription de tous les gènes sous la dépendance du promoteur transcriptionnel ExsA. La sécrétion/translocation des protéines couplées à une séquence tronquée et inactive d'ExoS : ExoS54, était effective seulement si on effectuait une déplétion

calcique du milieu de culture (ajout d'EGTA) en présence d'IPTG, ou lors d'un contact avec une cellule cible. (Epaulard et al., 2006).

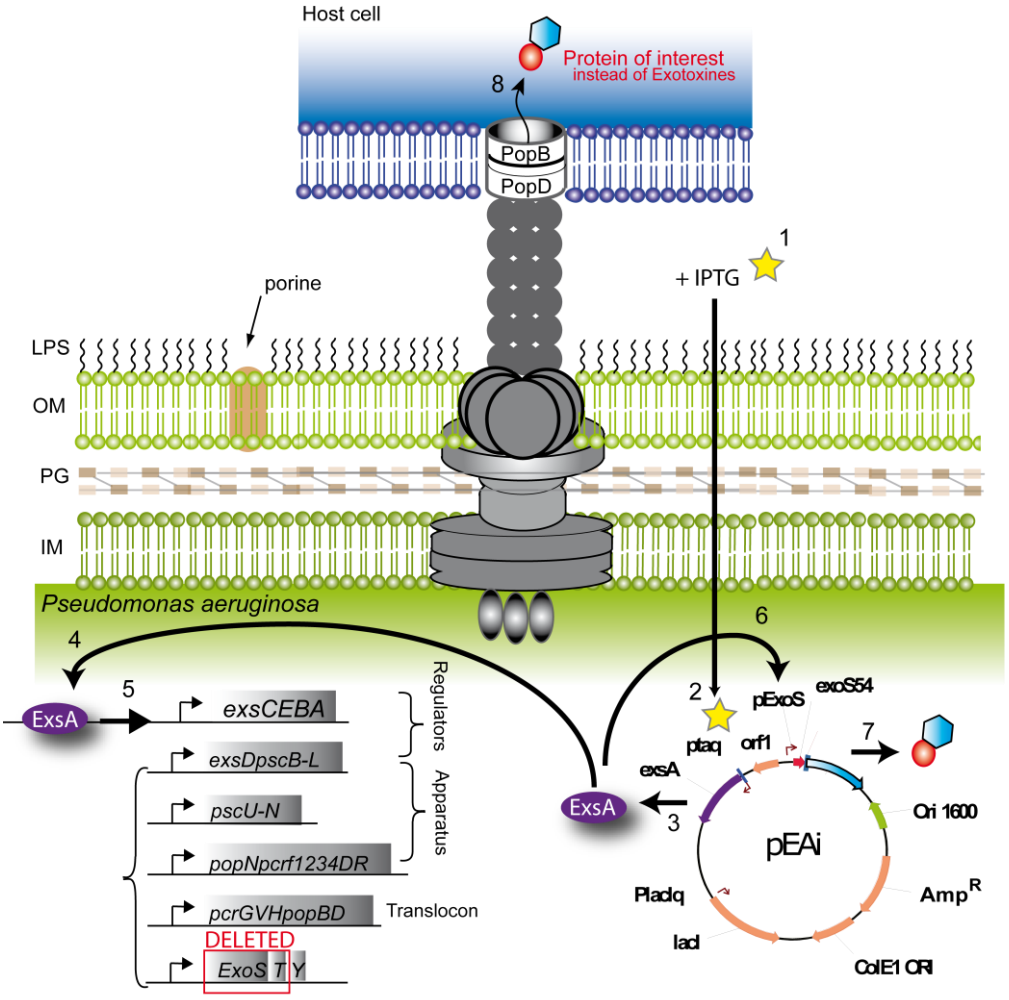


Figure 18 : Plasmide pEAI3 S54 (GenBank: JQ733380.1). Un ADNc d'intérêt est cloné en aval de la séquence codant ExoS54. La transcription d'exos54-séquence d'intérêt est sous la dépendance d'un promoteur activable par ExsA. La production d'ExsA est elle-même régulée par un promoteur inductible à l'IPTG (p*taq*). *orf1* : gène codant la protéine chaperonne d'ExoS ; RBS : ribosome binding site ; $lacI^Q$: gène codant un mutant du répresseur lac (transcription élevée) ; ColE1 ORI : origine de réplication utilisée par E.coli; *bla* : gène codant la β-lactamase (résistance à l'ampicilline) ; ori 1600 : origine de réplication utilisée par *Pseudomonas ; repB* : gène codant la protéine de réplication ; MCS : site de clonage multiple. (Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint, 2012)

3. Détoxification de la souche bactérienne

Dans un objectif de développement clinique, un travail important a été effectué pour réduire la toxicité de la souche et obtenir un déclassement en classe I des OGM par le Haut Conseil des Biotechnologies. Les gènes codant les exotoxines ExoS et ExoT ainsi que la protéine chaperonne Orf1 ont été délétés de la souche CHA, donnant naissance à la souche OST (Quénée et al., 2005) et réduisant ainsi la cytotoxicité de la bactérie de 50 % *in vitro* (Epaulard et al., 2006). Enfin d'autres gènes des voies métaboliques (tel que *aroA*) ou

participant à la virulence de la bactérie, tels que *lasI* et *rhlI* (gènes du *Quorum Sensing*), ont été également délétés pour obtenir les souches OA (CHAΔ*exoSexoTorf1aroA*), OAL(CHAΔ*exoSexoTorf1aroAlasI)* et ORL(CHAΔ*exoSexoTorf1rhlIlasI*) présentant une toxicité *in vitro* et *in vivo* nettement diminuée (Epaulard et al., 2008). La souche OAL a la plus faible toxicité *in vivo*, 10^9 bactéries peuvent être injectées à la souris C57BL/6 sans entrainer de mortalité (Epaulard et al., 2008). Le gène *aroA* code pour une enzyme essentielle à la synthèse des acides aminés aromatiques. Ainsi la délétion de ce gène rend la bactérie auxotrophe pour ces acides aminés et bloque alors sa dissémination *in vivo* (Epaulard et al., 2008; Fensterle et al., 2008; Kotton et al., 2006). L'expression du gène *lasI* induit la production la molécule N-3-Oxo-dodecanoyl Homoserine lactone (C12-HSL) qui contrôle la production de nombreux facteur de virulence impliqués dans la phase d'infection aiguë de la bactérie et la cytotoxicité, dont les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A et la protéase alcaline. De plus, C12-HSL inhibe la différentiation des lymphocytes T CD4+ en lymphocytes T helper Th1 et Th2, ainsi que la production de cytokines (Ritchie et al., 2003, 2005).

4. Applications : vectorisation de protéines pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique ou pour la thérapie cellulaire

L'utilisation de cette technologie présente deux intérêts thérapeutiques majeurs. Tout d'abord, la livraison de protéines thérapeutiques dans les cellules cibles comme décrite précédemment (partie 1 : Historique) dans un objectif de thérapie cellulaire. Cette approche est développée par une équipe américaine utilisant notre technologie. Bichsel *et al.* ont démontré que via l'utilisation du SST3 de *P. aeruginosa*, ils étaient capables de délivrer des facteurs de transcription dans des cellules pluripotentes et différenciés et d'induire la reprogrammation de fibroblastes en myocytes par l'injection du facteur de transcription MyoD (Bichsel et al., 2011, 2013).

La seconde application est l'utilisation de la bactérie et du SST3 comme vecteurs d'antigènes pour l'immunothérapie spécifique (BacVac pour *Bacterial Vaccine*), en particulier l'immunothérapie anti-tumorale spécifique (ASI). Comme nous avons pu le voir précédemment la particularité du vecteur bactérien *P. aeruginosa* est qu'il a la capacité d'injecter le ou les antigène(s) d'intérêt directement dans le compartiment intracellulaire des cellules eucaryotes, y compris dans les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques) qui vont interagir avec la bactérie *in vivo*. Suite à

l'injection dans la cellule, l'antigène est dégradé de manière identique aux protéines du « soi » et donc présenté via les molécules du CMH I. La bactérie possède également la faculté d'induire un signal de danger fort par le biais de la stimulation des PRRs, dont les TLRs et les NLRs, et d'induire la maturation des CPAg (expression de molécules de co-stimulation, de cytokines et surexpression des molécules du CMH II). Ce dernier paramètre est propice à la rupture de tolérance immunitaire vis-à-vis de l'antigène tumoral injecté qui va être présenté aux lymphocytes T CD8+ naïfs par les CPAg matures au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Figure 19).

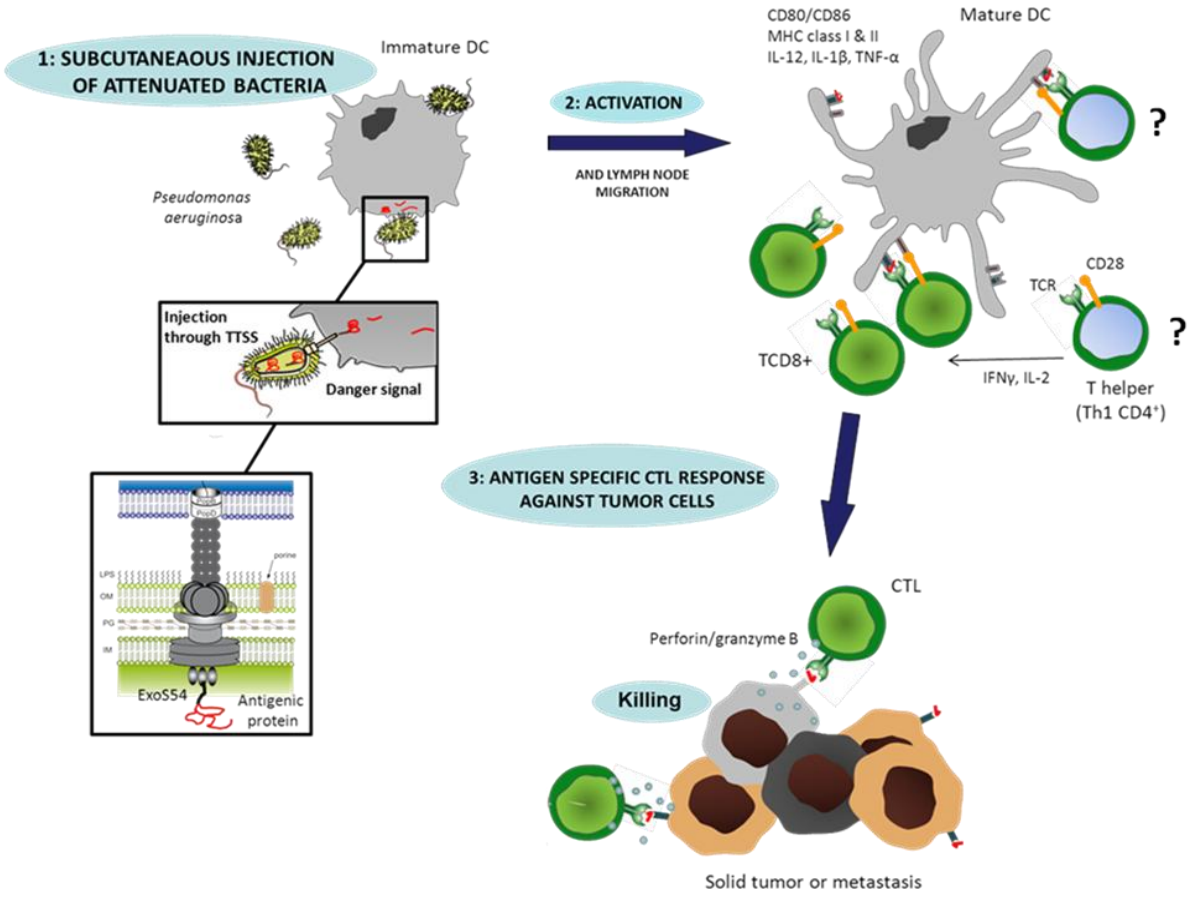


Figure 19 : Concept de l'immunothérapie anti-tumorale spécifique utilisant le SST3 de *P. aeruginosa*

La preuve de concept de cette approche a été effectué par Epaulard *et al.* en utilisant la souche *P. aeruginosa* OST capable de produire et d'injecter l'antigène artificiel OVA (OST S54-OVA) et le modèle tumoral de mélanome murin exprimant l'antigène OVA (B16-OVA) implanté en sous-cutanée (souris C57BL/6) (Epaulard et al., 2006). Dans un schéma prophylactique à 2 immunisations (*prime/boost*), plus de 90% des souris étaient protégées d'un challenge tumoral avec les cellules B16-OVA. Cette protection était directement liée à la capacité de la souche vaccinale à induire une réponse des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'OVA vis-à-vis de la tumeur. A l'heure actuelle, l'implication de la réponse des

lymphocytes T CD4+ helper spécifiques ou non spécifiques de l'antigène dans la réponse observée n'est pas connue. Différentes souches développées dans un objectif d'évaluation clinique et décrites dans la partie précédente ont également été évaluées en terme de toxicité et d'efficacité avec ce même modèle (Epaulard et al., 2008). La souche OAL présentait alors un bon compromis avec une diminution importante de toxicité (plus de 100 fois réduite par rapport à la souche OST) pour une efficacité légèrement plus faible.

Une approche thérapeutique a été envisagée avec la souche OST S54-OVA en immunisant les souris soit le même jour que l'implantation de la tumeur puis 7 jours plus tard, soit à 7 jours et à 14 jours après l'implantation des cellules B16-OVA. Ces schémas d'injection protégeaient respectivement environ 30% et 20% des souris d'un développement tumoral (Epaulard et al., 2008).

5. Optimisation de la souche vaccinale pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique

Dans un objectif d'amélioration de la réponse anti-tumorale mais également dans le but de faire évoluer rapidement la technologie vers une étude clinique, plusieurs optimisations ont été réalisées sur la souche vaccinale.

La réponse des lymphocytes T spécifiques a été amplifiée par l'ajout de la séquence PADRE (PAn HLA-DR Epitope) en aval de la séquence ExoS54 pour favoriser la réponse CD4+ T helper (Wang et al., 2012). PADRE est un épitope universel CMH II humain et murin capable d'induire une réponse T helper non spécifique pouvant amplifier la réponse CTL spécifique (Alexander et al., 1994).

Le schéma vaccinal thérapeutique a été modifié, les immunisations ont été débutées 1 jour après l'implantation de la tumeur et leur fréquence a été augmentée (tous les 4 jours). Enfin le nombre d'injections a été augmenté à 6. Il a été démontré que l'efficacité clinique était meilleure et que la réponse immune spécifique était plus forte avec ce nouveau schéma (Wang et al., 2012).

Une souche vaccinale capable de pousser en milieu chimiquement défini (CLIN1) a été créée à partir de la souche OAL afin de répondre au requis des Bonnes Pratiques de Fabrication pharmaceutiques (production GMP). Cette nouvelle souche a été testée en termes d'efficacité et de toxicité et donnait un effet comparable à la souche OAL en modèle B16-OVA (Wang et al., 2012). La souche CLIN1 a été enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de

Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur et son utilisation est protégée par un brevet international (WO 2013/087667).

Enfin la démonstration de l'efficacité de la souche CLIN1 a été effectuée dans un modèle murin de glioblastome GL26 en utilisant les antigènes natifs *tyrosinase-related protein 2* (Trp2) et *glycoprotein 100* (gp100) (Wang et al., 2012). Pour cette étude, une souche CLIN1 capable de produire et d'injecter 2 antigènes indépendants, couplés chacun à ExoS54, a été mise au point (souche bi-antigénique). L'utilisation de cette souche a amélioré l'effet antitumoral en schéma d'immunisation prophylactique et thérapeutique en comparaison à une souche CLIN1 exprimant un seul des 2 antigènes.

IV. Sécurisation de la souche vaccinale

1. Quels sont les besoins en termes d'atténuation ?

L'injection du vecteur bactérien, même atténué, dans le cadre d'un futur traitement antitumoral peut être associée à des complications plus ou moins sévères chez des patients déjà fragilisés par leur cancer. Les principaux risques sont la multiplication et la dissémination de la souche dans l'organisme (infection) et dans l'environnement (contamination des populations et dissémination environnementale).

L'utilisation de vecteurs bactériens est réglementée depuis peu par les agences de régulation (ANSM, EMEA), qui classifient ce genre de traitement dans « les médicaments de thérapie innovante ou de thérapie génique ». Ces traitements s'apparentent à une vaccination thérapeutique qui est encore peu représentée sur le marché. De plus, il s'agit dans la majorité des cas d'organismes génétiquement modifiés qui requièrent une autorisation du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) pour être utilisés et développés.

Les travaux réalisés au laboratoire pour atténuer la toxicité du vecteur ont finalement conduit à un déclassement des souches CHA-OA et CHA-OAL en classe 1 (non pathogènes) des organismes génétiquement modifiés (validé par le HCB). Cette décision autorise leur manipulation en lieu de confinement peu contraignant et « valide » en quelque sorte l'innocuité de ces souches. Toutefois, il est nécessaire de ne pas atténuer excessivement la toxicité de la souche qui contribue en grande partie à l'efficacité de la réponse immune provoquant une réponse inflammatoire locale indispensable à l'activation de l'immunité adaptative.

Idéalement, nous devons produire une souche conservant à la fois ses propriétés immunostimulantes et sa capacité de vecteur d'antigènes, et dont l'atténuation de la virulence

s'effectue par l'inactivation de la réplication de la bactérie. Nous sécuriserons ainsi l'utilisation du vecteur tout en limitant les risques de dissémination dans l'environnement. Enfin ce type de souche vectrice devrait être plus facilement accepté par les instances réglementaires.

2. Le concept des bactéries « *Killed But Metabolically Active* »

Brockstedt *et al.* ont mis au point une nouvelle classe de vaccins (Brockstedt et al., 2005) basée sur un traitement photochimique utilisé pour inactiver les pathogènes et les cellules nucléées des prélèvements plaquettaires et plasmatiques humains (Wollowitz, 2001). Ce procédé a été repris par plusieurs équipes pour développer également des vaccins anti-infectieux (Dubensky et al., 2012a).

Principe du traitement photochimique et application

Le concept INTERCEPT Blood System®, développé par **Cerus Corporation**, permet d'inactiver les contaminants bactériens, viraux et cellulaires dans les préparations de concentrés plaquettaires ou de produits plasmatiques, par l'utilisation conjointe de psoralène S-59 (amotosalène-HCl, Intercept Blood System®, Cerus corporation) et d'UVA (rayons ultraviolets de grandes longueurs d'onde). Le psoralène S-59 (amotosalène) synthétique a la particularité d'être hautement réactif et moins toxique que le psoralène.

Il s'agit d'une molécule qui a pour propriété de se fixer aux bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN. Des pontages covalents irréversibles vont se former lors d'une exposition du milieu à des rayons ultraviolets de grande longueur d'onde (UVA). Ce traitement photochimique entraîne l'inactivation de la réplication cellulaire (bloquage de la division cellulaire) et bloque par conséquent la prolifération des différents contaminants éventuels des produits sanguins (Figure 20).

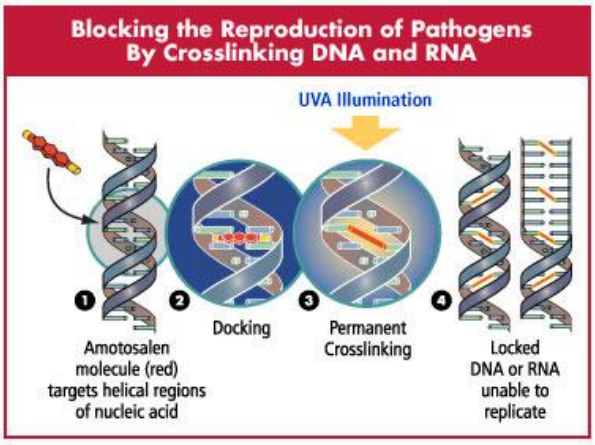


Figure 20 : Principe du traitement photochimique (d'après Cerus Corporation. www.cerus.com)

L'efficacité du système a été validée pour de nombreuses bactéries, notamment *P. aeruginosa* ; les résultats sont résumés dans le tableau 3. On constate une réduction de 4,5 log du nombre de bactéries présentes.

Espèces bactériennes testées avec INTERCEPT Blood System	Étendue de l'inactivation* (réduction $\log_{10}$)	
	Plaquettes suspendues dans du plasma/solution additive	Plaquettes suspendues dans du plasma
Bactéries Gram-négatives		
Escherichia coli	>6,4	≥7,3
Serratia marcescens	>6,7	-
Klebsiella pneumoniae	>5,6	≥6,7
Pseudomonas aeruginosa	4,5	-
Salmonella choleraesuis	>6,2	-
Yersinia enterocolitica	>5,9	>7,3
Enterobacter cloacae	5,9	-
Anaplasma phagocytophilum (agent de l'EGH)**	-	>4,2
Bactéries Gram-positives		
Staphylococcus epidermidis	>6,6	>7,4
Staphylococcus aureus	6,6	>7,6
Streptococcus pyogenes	>6,8	-
Listeria monocytogenes	>6,3	-
Corynebacterium minutissimum	>6,3	-
Bacillus cereus (dont les spores)	3,6	-
Bacillus cereus (état végétatif)	>6,0	-
Bifidobacterium adolescentis	>6,5	-
Propionibacterium acnes	>6,7	-
Lactobacillus species	>6,9	-
Clostridium perfringens (état végétatif)	>7,0	-
Bactérie spirochète		
Treponema pallidum (syphilis)	≥6,8 à ≤7,0	>5,9
Borrelia burgdorferi (maladie de Lyme)	>6,8	>10,6

* « > » : inactivation en dessous de la limite de la détection du dosage

** : intracellulaire

« - » signifie non testé.

Tableau 3 : Inactivation des bactéries par Intercept Blood System®. Traitement photochimique appliqué: 150µM de psoralène S-59 et 3J/cm² d'UVA.

« Détournement de PCT »

En réponse aux pontages multiples induits par un traitement photochimique, on observe une activation de la voie NER (Nucleotide Excision Repair), permettant la réparation de l'ADN et de l'ARN via l'exonucléase ABC de la bactérie. L'exonuclease ABC est constituée de 3 sous-unités protéiques indissociables A, B et C codées par les gènes *uvrA, uvrB et uvrC* (*ultraviolet-light response genes*) (Van Houten et al., 2005).

Le concept des vaccins KBMA est basé sur l'idée que des mutants bactériens déficients en réparation (délétés pour les gènes codant 2 sous-unités de l'exonuclease ABC (*uvrA* et *uvrB*)) sont beaucoup plus sensibles au traitement photochimique et ainsi plus facilement inactivables. En effet, une faible exposition des mutants au PCT serait corrélée à l'apparition de rares pontages de psoralène S-59 sur l'ADN permettant de conserver intacte l'expression du génome (et du transcriptome…), tout en bloquant la réplication bactérienne (Brockstedt et al., 2005). En théorie un seul pontage dans l'ADN suffirait à bloquer la réplication de la bactérie.

Brockstedt *et al.* ont montré l'innocuité et l'efficacité de ce vecteur bactérien KBMA en immunothérapie anti-tumorale et anti-infectieuse avec la bactérie *Listeria monocytogenes* (Brockstedt et al., 2005; Skoberne et al., 2008). Le procédé a été ensuite appliqué et validé sur *Salmonella typhimurium* et *Bacillus anthracis* pour le développement de vaccins anti-infectieux (Lankowski and Hohmann, 2007; Skoble et al., 2009).

Nous verrons dans la partie Résultats la mise au point et la caractérisation du procédé d'atténuation KBMA pour la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* effectuée pendant ce travail de thèse.

E. L'ANHYDRASE CARBONIQUE 9 : ANTIGENE D'INTERET POUR L'IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS ?

Les *alpha*-anhydrases carboniques appartiennent à la famille des métalloenzymes à noyau zinc et catalysent l'hydratation réversible du CO_2 selon la réaction $CO_2 + H_2O <=> HCO_3^- + H^+$. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, notamment dans la respiration, la régulation du pH, la sécrétion d'électrolytes, les réactions biosynthétiques (gluconéogenèse, la lipogenèse, l'uréogenèse), la résorption osseuse et le développement tumoral. Chez l'homme, 16 isoformes sont connues et plusieurs inhibiteurs, notamment de l'anhydrase carbonique II sont utilisés comme médicaments contre le glaucome (Supuran, 2008a).

I. L'Anhydrase carbonique 9 : structure, localisation cellulaire et tissulaire

L'isoforme 9 (AC9) est une glycoprotéine transmembranaire dimérique dont la structure a été partiellement résolue (Alterio et al., 2009; Hilvo et al., 2008) (Figure 21). Elle est constituée d'un domaine « protéoglycane-like » extracellulaire, d'un domaine catalytique extracellulaire et d'un court peptide intracellulaire.

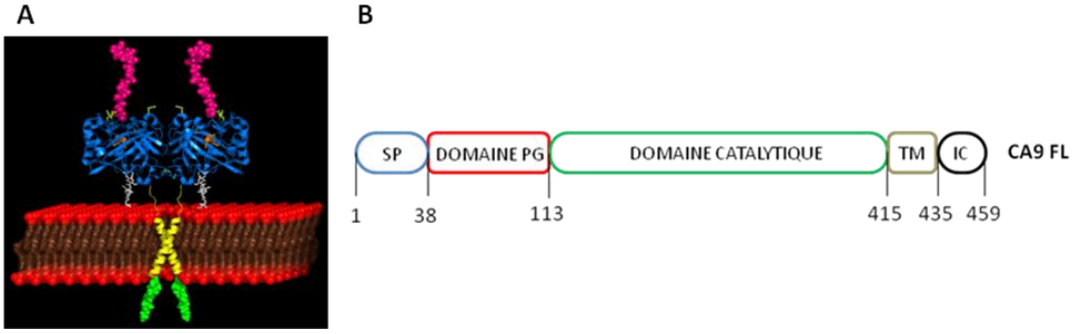


Figure 21 : Structure de l'anhydrase carbonique 9. (A) La structure dimérique du domaine catalytique caractérisée par rayon X est représentée en cyan, les parties glycanes sont en blanc. Les domaines PG-like (magenta), transmembranaires (jaune) et cytoplasmiques (vert) sont proposés ici de façon hypothétique (Alterio et al., 2009). **(B)** Représentation schématique de la structure primaire de l'anhydrase carbonique 9 humaine (FL, *Full-Length*). SP: signal peptide; TM : hélice transmembranaire; IC : queue intra-cytoplasmique; PG : domaine « protéoglycane-like ».

Cette protéine associée aux tumeurs a été identifiée pour la première fois sur la lignée de carcinome utérin HeLa par le groupe de S. Pastorekova (Pastoreková et al., 1992), puis clonée et caractérisée en 1994 par J. Pastorek qui ignorait à ce moment là qu'elle était une *alpha*-anhydrase carbonique (Pastorek et al., 1994). Ce n'est que 2 années plus tard, après

séquençage et étude de la protéine (activité enzymatique), que les travaux de ce même groupe ont permis d'identifier cette protéine (MN/CA9) comme membre des *alpha*-anhydrases carboniques (Opavský et al., 1996).

Une expression particulièrement élevée d'AC9 a été mise en évidence par immunohistochimie principalement dans les carcinomes de tissus variés (sein, rein, prostate, col de l'utérus, vessie, ovaires, cerveau, poumons, foie, pancréas, colon, œsophage, vulve) mais aussi gliomes et mésotheliomes (Ivanov et al., 2001) (Figure 22).

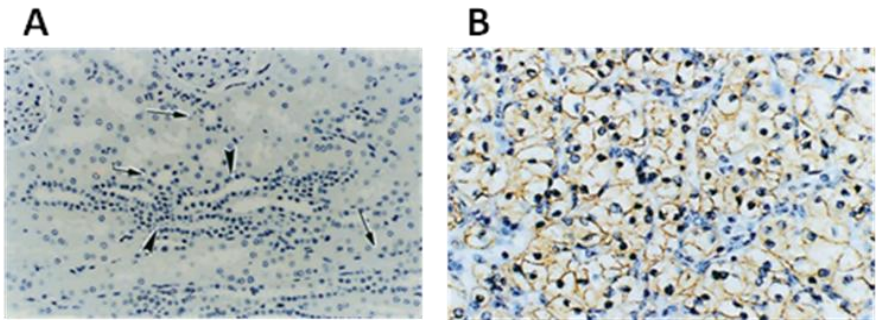


Figure 22 : Immunomarquage de l'anhydrase carbonique 9 d'un tissu rénal sain (A) et d'un tissu d'adénocarcinome rénal à cellules claires (B). Le rein normal est négatif pour l'expression de l'AC9 alors qu'on observe un marquage membranaire dans le carcinome rénal à cellules claires (CRcc) (Ivanov et al., 2001).

Dans les tissus sains chez l'homme, on retrouve une forte expression limitée à la muqueuse gastrique, à l'épithélium des voies biliaires et pancréatiques et aux cryptes de l'intestin grêle. Dans de rares cas, l'AC9 a été observée à la surface de l'épithélium ovarien, des cellules du « rete testis » fœtal et des cellules mésothéliales (Ivanov et al., 2001; Leibovich et al., 2007).

Chez la souris adulte, l'expression de l'AC9 se limite principalement à la muqueuse gastrique (Hilvo et al., 2004).

Dans le cas du cancer du rein, cette expression est particulièrement exacerbée, alors qu'elle est totalement absente du tissu sain adjacent. L'expression de l'AC9 a été etudiée dans différents sous-types histologiques de tumeurs rénales par RT-PCR et immunohistochimie (Bismar et al., 2003; Leibovich et al., 2007; Uemura et al., 1999). Une étude rétrospective publiée en 2007 sur 933 patients traités par néphrectomie pour un cancer du rein unilatéral, retrouvait une expression de l'AC9 dans 97% des carcinomes à cellules claires (708/730) (Leibovich et al., 2007), 23,2% des carcinomes papillaires (36/155) et 4,2 % des carcinomes à cellules chromophobes (2/48) (Leibovich et al., 2007). Bismar et al. avaient déjà observé, lors d'une étude menée par PCR en temps réel en 2003, une expression de l'AC9 pour 100 % des CRcc alors qu'elle était absente pour les autres sous-types histologiques de carcinomes rénaux et pour le tissu rénal sain (Bismar et al., 2003).

II. Régulation de l'expression et de l'activité de l'AC9

L'hypoxie, et plus précisément le facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF-1α, régule l'expression et l'activité de l'AC9 (Kaluz et al., 2009; Svastová et al., 2004; Wykoff et al., 2000). Le gène codant l'AC9 est d'ailleurs le gène le plus fortement régulé par l'hypoxie dans les cellules tumorales humaines.

En conditions normoxiques, HIF-1α est hydroxylé puis ubiquitinylé par la protéine de Von Hippel Lindau (pVHL) ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Figure 23). Le complexe actif HIF-1α-HIF-1β ne se forme pas et la transcription des gènes cibles n'est donc pas initiée.

En conditions hypoxiques, comme c'est le cas dans de nombreuses tumeurs solides, la liaison de pVHL à HIF-1α est inhibée et entraîne l'accumulation de HIF-1α et favorise ainsi son association à la sous-unité HIF-1β. Le complexe HIF-1 stabilisé va entrainer la transcription d'un grand nombre de gènes induits par l'hypoxie, dont le gène codant l'AC9.

Cependant, il a été démontré que la culture *in vitro* de cellules tumorales à densité élevée entrainait une hypoxie artificielle et pouvait induire l'expression de l'AC9 suite à l'induction de la transcription par HIF-1, mais indépendamment de la stabilisation du complexe HIF-1α/HIF-1β. Ces conditions de culture induisent en plus l'activation de la voie de signalisation PI3K qui participe à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α, en présence d'une légère hypoxie (Kaluz et al., 2002; Shafee et al., 2009) .

Dans le cas particulier du CRcc, où la mutation ou l'inactivation du gène VHL est observée dans 95% des cas, on retrouve une accumulation de HIF-1α, qui va « simuler » le phénomène hypoxique et entrainer une expression constitutive de l'AC9 (Grabmaier et al., 2004; Ivanov et al., 2001; Stillebroer et al., 2010) (Figure 23).

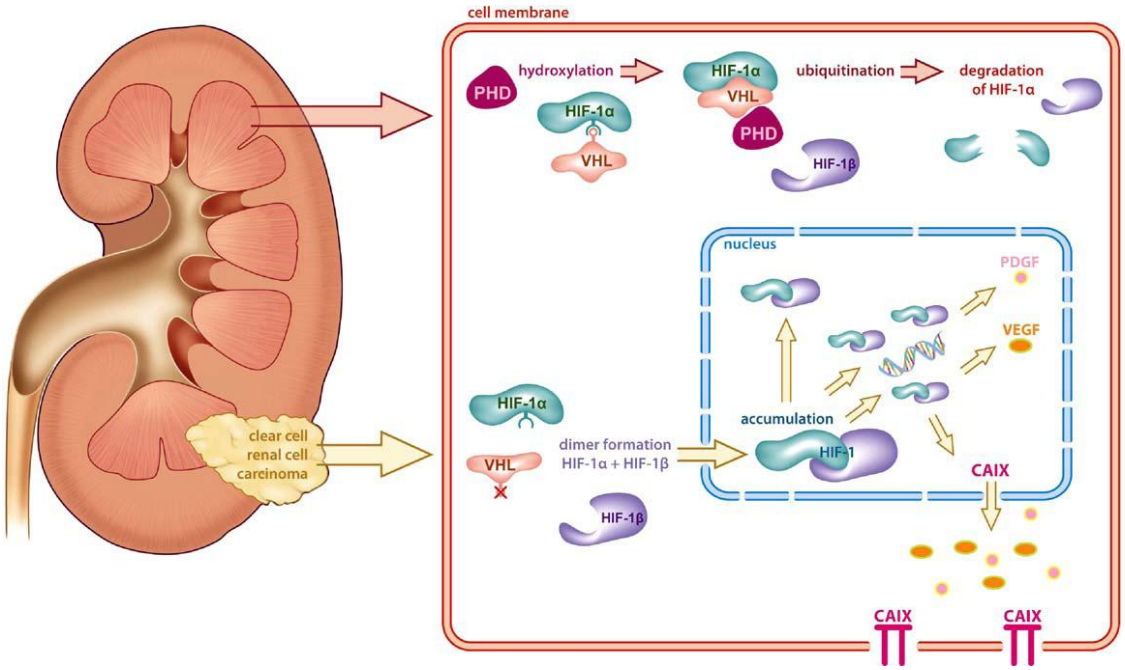


Figure 23 : L'expression de l'anhydrase carbonique 9 est liée indirectement à la protéine Von-Hippel-Lindau (pVHL). PHD : Prolyl Hydroxylase Domain ; HIF1-α : Hypoxia Inducible Factor 1- α ; PDGF : Platelet Derived Growth Factor ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor ; CAIX : Carbonic Anhydrase 9 (Stillebroer et al., 2010).

Plusieurs études récentes ont suggéré que les domaines intracellulaires et « protéoglycane-like » jouaient un rôle essentiel dans la modulation de l'activité enzymatique de l'AC9 (Ditte et al., 2011; Dorai et al., 2005; Hulikova et al., 2009; De Simone and Supuran, 2010; Zatovicova et al., 2010). Le domaine PG-like favorise une activité catalytique élevée de l'enzyme même à des valeurs de pH faible, où de nombreuses enzymes sont habituellement inactives (De Simone and Supuran, 2010). Le domaine intracellulaire présente plusieurs sites de phosphorylation qui peuvent moduler l'activité du domaine catalytique extracellulaire de l'enzyme (Ditte et al., 2011; Dorai et al., 2005).

III. Rôle de l'AC9

1. Tissu sain

Chez la souris adulte normale, l'invalidation de l'AC9 provoque principalement une hyperplasie de l'épithélium glandulaire gastrique, ainsi que de nombreux kystes (Gut et al., 2002). Néanmoins les souris se développent normalement et présentent un pH gastrique normal, ainsi que des niveaux normaux de sécrétion acide et de gastrine.

Par ailleurs une déficience en AC9 ne semble pas promouvoir l'apparition de tumeurs, bien que des cas de pathologies dégénératives du cerveau aient été observées chez la souris *ca9* $^{-/-}$ âgée (Leppilampi et al., 2005; Pan et al., 2012).

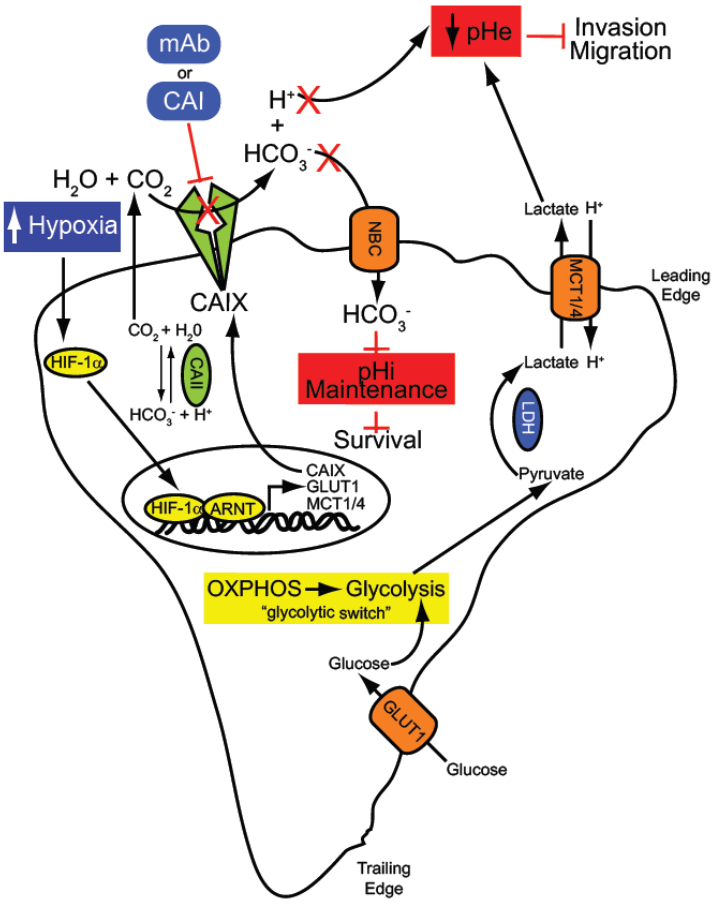
2. Tissu tumoral

Rôle dans le contrôle du pH tumoral

La régulation du pH par les cellules tumorales est relativement complexe et implique une grande variété de protéines et de systèmes tampons ayant pour objectif de maintenir un pH intracellulaire légèrement alcalin, favorable à la survie des cellules (Parks et al., 2011). Ceci entraine une nette acidification de l'environnement extracellulaire.

L'AC9 est caractérisée par une activité exceptionnelle au sein des *alpha*-anhydrases carboniques, ce qui lui confère un rôle majeur dans la régulation du pH extra- et intracellulaire (Hilvo et al., 2008; Swietach et al., 2008, 2009, 2010), particulièrement dans ce contexte tumoral (Parks et al., 2011; Sedlakova et al., 2014). Le site actif de l'AC9 localisé au niveau membranaire va contribuer à l'acidification du microenvironnement tumoral en conditions hypoxiques par la réaction qu'elle catalyse (CO_2+ H_2O → H^++ HCO_3^-). Le CO_2, produit de dégradation du métabolisme actif des cellules tumorales diffuse à travers la membrane cellulaire et subit une hydratation par l'AC9. Les bicarbonates générés vont être transportés dans le cytoplasme et participer à l'alcalinisation du milieu intracellulaire, alors que les protons restent au niveau extracellulaire (Figure 24) (McDonald et al., 2012).

Ainsi l'AC9 contribue à produire et à maintenir un pH intracellulaire alcalin favorable à la croissance tumorale, mais favorise aussi l'acidification de l'espace extracellulaire, facilitant l'invasion et la migration tumorale (Chiche et al., 2009; Parks et al., 2011; Svastova et al., 2012; Swietach et al., 2009).



<u>Figure 24</u> : L'inhibition de l'activité de l'AC9 diminue la survie et l'invasion des cellules tumorales. Les cellules tumorales reprogramment leur métabolisme pour favoriser la voie de la glycolyse ("glycolytic switch") ce qui entraine une augmentation de la production de lactate et son transport vers l'espace extracellulaire, conduisant à une baisse du pH extracellulaire. Une conséquence de cette acidification du pHe est la perturbation du pH intracellulaire, qui affecte les fonctions cellulaires essentielles. La surexpression de l'AC9 lors de l'hypoxie va permettre de catalyser la réaction CO2 + H2O →HCO3- + H+ au niveau de l'espace extracellulaire. Les ions HCO3- sont activement transportés dans la cellule, permettant le maintien du pH intracellulaire et la survie de la cellule. Les protons participent à la formation d'un pH extracellulaire de plus en plus acide, favorisant l'invasion et la dissémination des cellules tumorales. L'inhibition de l'activité catalytique de l'AC9 par des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs spécifiques prévient la production des métabolites enzymatiques et permet de diminuer la survie des cellules et de réduire l'invasion tumorale (McDonald et al., 2012).

Rôle dans l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération des cellules tumorales

En plus de son rôle dans la régulation du pH des cellules tumorales et de leur survie, plusieurs études décrivent l'implication de l'AC9 dans l'adhésion cellulaire et la migration des cellules tumorales et ainsi dans le processus métastatique (Cecchi et al., 2005; Chiche et al., 2009; Dorai et al., 2005; Parkkila et al., 2000; Pastorekova et al., 2008; Robertson et al., 2004; Shin et al., 2011; Svastová et al., 2003, 2004; Zavadova and Zavada, 2005).

La partie « protéoglycane-like » (PG-like) jouerait plutôt un rôle dans l'adhésion et la communication inter-cellulaire et par conséquent serait en partie responsable de l'invasion tumorale (Csaderova et al., 2013; Shin et al., 2011; Svastová et al., 2003; Závada et al., 2000; Zavadova and Zavada, 2005). L'hypoxie induit l'invasion tumorale via une diminution de l'adhésion intercellulaire médiée par l'E-cadhérine (Svastová et al., 2003). L'AC9 pourrait intervenir dans ce processus en interagissant avec la β-caténine, qui intervient activement dans les mécanismes de l'adhésion cellulaire (Pastorekova et al., 2008; Svastová et al., 2003). Une étude d'expression de gènes par l'utilisation de puces à ADN a été effectuée dans une lignée de carcinome du col de l'utérus transfectée par l'AC9. Le profil d'expression de gènes obtenu révèle une expression différentielle de gènes impliqués dans croissance, l'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette en comparaison à la lignée non transfectée. De plus, les cellules transfectées présentaient une diminution de l'adhésion intercellulaire et une augmentation de la motilité (Shin et al., 2011). Enfin une réduction de la prolifération cellulaire est observée lorsque l'AC9 est inhibée, particulièrement lorsque les cellules surexpriment fortement la protéine (Morris et al., 2011).

En résumé, l'expression tumorale majoritaire de l'AC9, ainsi que son rôle dans le développement tumoral en fait une cible thérapeutique d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs mais aussi pour l'immunothérapie anti-tumorale. De nombreuses études se sont également intéressées à la valeur diagnostique et pronostique de ce biomarqueur dans différents types de cancers (Gieling and Williams, 2013; McDonald et al., 2012).

IV. L'AC9 cible thérapeutique

L'implication de l'AC9 dans la tumorigenèse en fait une cible à fort potentiel thérapeutique pour plusieurs raisons :

- Elle est surexprimée de manière sélective sur les cellules tumorales et son expression sur le tissu normal est très restreinte.
- Elle joue un rôle critique dans la croissance tumorale, le développement de métastases, la survie cellulaire et l'adhésion cellulaire.
- Elle est retrouvée au niveau extracellulaire (notamment son domaine actif), facilitant le ciblage par des inhibiteurs ou des anticorps.
- En modèle préclinique, chez la souris, il a été démontré que l'inactivation de la protéine (inactivation du gène ou utilisation d'inhibiteurs) dans les tumeurs

hypoxiques était délétère à la croissance et au développement de métastases (Chiche et al., 2009; Lou et al., 2011).

Deux principales approches thérapeutiques ont été évaluées à ce jour, les anticorps monoclonaux et des petites molécules inhibitrices, qui ont donné plusieurs résultats encourageants. Ces différentes stratégies ciblent particulièrement les carcinomes rénaux à cellules claires. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux stratégies d'immunothérapie active qui ont été explorées.

1. Inhibiteurs

Plusieurs classes d'inhibiteurs ont été développés et sont maintenant bien décrits pour inhiber l'anhydrase carbonique 9 (Supuran, 2008a), et des composés comme les sulfonamides/sulfamates ou les coumarines sont particulièrement prometteurs pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. *In vitro*, ces inhibiteurs ont pour propriété de diminuer l'acidification du pH extracellulaire et indirectement de déstabiliser la régulation du pH intracellulaire de la cellule tumorale. La survie et l'invasion cellulaire sont alors altérées. Le mécanisme d'action de ces 2 classes d'inhibiteurs est assez différent, les sulfonamides se fixant par une liaison de coordination à l'ion zinc du site actif, alors que les coumarines se lient de manière irréversible (inhibiteur suicide) à l'entrée du site actif, bloquant la réaction enzymatique (Maresca et al., 2009; Supuran, 2008a).

Plusieurs essais précliniques chez la souris sur des modèles orthotopiques de xénogreffes de tumeur du sein humaines ont démontré l'efficacité de ces composés sur la croissance tumorale et le développement de métastases (Lou et al., 2011; Pacchiano et al., 2011; Touisni et al., 2011).

L'enjeu actuel consiste à développer des molécules plus spécifiques que celles proposées ces dernières années. En effet l'AC9 est une enzyme particulièrement difficile à cibler, en raison du nombre important d'isoformes d'anhydrases carboniques, et de leur localisation ubiquitaire. L'anhydrase carbonique II est notamment présente en grande quantité au niveau intracellulaire et joue un rôle physiologique indispensable pour la régulation du pH. Pour parfaire à ce manque de spécificité, les pharmacologues développent d'autres classes d'inhibiteurs incapables de passer au travers de la membrane plasmique.

Quant à l'AC12, retrouvée sur la membrane plasmique, elle est également surexprimée sur les cellules tumorales et sur de nombreux organes (reins, intestins, yeux, organes reproducteurs)

(Supuran, 2008a). Une étude parue récemment a démontré l'efficacité anti-tumorale, sur plusieurs modèles de xénogreffes de tumeurs humaines, d'un anticorps monoclonal inhibant l'activité de l'AC12 (Gondi et al., 2013). Du fait de sa distribution tissulaire, il faudra cependant veiller à l'apparition d'effets secondaires sur les tissus sains si des essais cliniques sont envisagés.

2. Immunothérapie passive

Anticorps monoclonaux thérapeutiques

L'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux spécifiques de l'AC9 peut être la conséquence de plusieurs mécanismes d'action. Les anticorps peuvent se lier directement à l'AC9 et provoquer une réponse ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) vis-à-vis des cellules tumorales ou encore le complexe AC9/anticorps peut être internalisé par la cellule et délivrer son principe actif (anticorps couplé à des radioisotopes ou à des molécules cytotoxiques), et dans ce cas jouer le rôle de vecteur de thérapies ciblées. Enfin, plus récemment des anticorps ont été développés dans le but d'intéragir avec le site actif de l'AC9 et d'inhiber son activité enzymatique.

Jusqu'à présent, un seul anticorps monoclonal chimérique cG250 dirigé contre le domaine « PG-like » de l'AC9 (Girentuximab, RENCAREX®, WILEX AG, Munich), développé il y a 25 ans par l'équipe de E.Oosterwijk (Oosterwijk et al., 1986), a été évalué en essais précliniques et cliniques (Oosterwijk-Wakka et al., 2013). Des essais cliniques de phase I et II ont démontré que l'anticorps était bien toléré et que des résultats positifs étaient obtenus sur la tumeur en traitement seul ou associé à l'IFNα (Bleumer et al., 2004; Davis et al., 2007; Siebels et al., 2011). Il avait été précédemment établi que cet effet thérapeutique observé été lié à un mécanisme ADCC (Surfus et al., 1996).

La récente étude clinique de phase III ARISER (Adjuvant RENCAREX® Immunotherapy Phase III trial to study efficacy in non-metastatic RCC, http://www.wilex.de/portfolio-english/rencarex/phase-III-ariser) ayant pour objectif de réduire les rechutes chez des patients néphrectomisés suite à un CRcc non métastatique, n'a cependant pas atteint ses critères d'évaluation primaires. Les résultats de l'étude ne montrent pas d'amélioration de la survie sans récidive (environ 72 mois) suite au traitement par RENCAREX® en comparaison au groupe placébo. Cependant, des résultats préliminaires démontrent que lorsque l'expression de l'AC9 augmente dans le tissu tumoral (évaluation basée sur un score), le traitement est plus

efficace. En effet, la survie sans récidive est statistiquement et cliniquement améliorée dans la population de patients traités dont l'expression de l'AC9 dans la tumeur est élevée en comparaison au groupe placébo et à la population traitée mais avec une expression faible d'AC9 (Communiqué de presse de WILEX AG du 26 février 2013, http://www.wilex.de/press-investors/announcements/press-releases/20130226-2).

L'anticorps cG250 a aussi été exploité comme vecteur pour la thérapie ciblée, notamment en le couplant à des radionucléides. En effet certains anticorps ont la propriété d'induire l'internalisation de leur « récepteur », ce qui peut permettre de délivrer un agent actif dans le cytoplasme de la cellule cible après dégradation du complexe par le lysosome. Un effet thérapeutique a été observé *in vivo,* chez la souris, sur des xénogreffes de tumeurs lorsqu'un traitement par l'anticorps cG250 couplé à des radioisotopes (^{177}Lu et ^{90}Y) est administré (Brouwers et al., 2004). Plusieurs études cliniques de phase I dans le traitement des CR avancés ou métastatiques ont été effectués avec ^{131}I ou ^{177}Lu couplé à cG250 avec des résultats encourageants mais assez hétérogènes (Oosterwijk-Wakka et al., 2013).

Plus récemment un anticorps monoclonal anti-AC9 identifié à partir d'une banque de phages et conjugué à la monomethyl auristatin E (MMAE), un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline qui induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, a été évalué dans plusieurs modèles précliniques de xénogreffes de tumeurs humaines (Petrul et al., 2012). L'efficacité anti-tumorale était corrélée à l'expression de l'AC9, avec l'observation de réponses partielles et complètes dans certains modèles à la suite de l'injection d'une simple dose, dont le mécanisme d'action était typique de la MMAE (Petrul et al., 2012).

Enfin une dernière approche dans le développement des anticorps monoclonaux anti-CA9 a été de cibler spécifiquement le domaine catalytique de l'enzyme, afin de produire des anticorps inhibiteurs, entravant sa fonction de régulateur du pH tumoral. Des banques de phages ont été utilisés pour identifier des anticorps se liant au domaine catalytique et plusieurs candidats capables d'inhiber fortement l'enzyme *in vitro* ont été découverts (Murri-Plesko et al., 2011; Xu et al., 2010). Il n'y a pas encore eu d'études *in vivo* réalisées avec ces anticorps.

L'association de plusieurs mécanismes d'action (ADCC, inhibition de l'enzyme, anticorps conjugué) pour un même anticorps ciblant l'AC9 s'avère être une voie de développement prometteuse.

Transfert adoptif de lymphocytes T autologues

Un essai clinique a été effectué sur 3 patients atteints de carcinomes rénaux métastatiques $CA9^+$ traités conjointement par IL-2 et par des lymphocytes T autologues génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique, capables de reconnaitre l'AC9. Les fragments variable de l'anticorps cG250 (scFv (G250)) sont couplés aux chaînes α et β du TCR, intervenant dans la signalisation du récepteur (Lamers et al., 2006). Cette stratégie permet une reconnaissance directe de l'AC9 par les LT indépendamment d'une présentation de l'antigène par les voies du CMH. Lors des premières injections de LT scFv (G250) il n'y a pas eu de toxicité observée mais au bout de la $4^{ème}$ ou $5^{ème}$ injection, une élévation importante des enzymes hépatiques s'est produite, nécessitant l'arrêt immédiat du traitement chez 2 patients. Suite à une biopsie hépatique, il a été décrit une infiltration de lymphocytes T autour des conduits biliaires. Cette observation suggère fortement que cette hépatotoxicité soit la conséquence d'une reconnaissance de l'AC9, exprimée sur les cellules épithéliales des conduits biliaires, par les LT scFv(G250). Cette toxicité peut être évitée par l'administration d'une faible dose de l'anticorps cG250 avant l'injection de LT scFv(G250), permettant de bloquer les sites antigéniques présents sur le tissu sain. Cette stratégie a déjà été employée dans différentes études de radioimmunothérapie avec l'anticorps cG250, où aucune toxicité hépatique n'a été décrite (Lamers et al., 2006).
Enfin les auteurs ont publié plus récemment les résultats de l'étude sur 11 patients où aucune réponse clinique objective au traitement n'a été observée suite aux différentes injections. Par ailleurs le développement de réponse immune cellulaire ou humorale dirigée contre les LT scFv (G250), ainsi qu'une persistance limitée des lymphocytes *in vivo* chez la majorité des patients, a été décrite (Lamers et al., 2011).

3. Immunothérapie active

Pertinence de l'antigène

Selon les critères d'évaluation des antigènes de tumeur, proposé par le *National Cancer Institute* (étude de Cheever et al. détaillée dans le chapitre II : *Un message antigénique pour l'immunothérapie anti-tumorale*), l'anhydrase carbonique 9 se place en $62^{ème}$ position sur les 75 antigènes recensés, lorsque l'on exclut les critères d'immunogénicité et de démonstration d'efficacité en clinique. Il a été décrit précédemment que l'AC9 jouait un rôle important dans la tumorigenèse et que son inhibition ou son inactivation diminuait la croissance de la tumeur

et le développement de métastases. En revanche, il est vrai que l'apparition et le développement de la tumeur ne sont pas intrinsèquement liés à l'expression de l'AC9, à l'instar de cancers induits par l'expression d'antigènes viraux (HPV E6 E7, *EBV latent membrane protein 2*, etc…) ou de protéines mutées (p53, HER-2, *survivin*, etc…).

En terme de spécificité, là encore l'AC9 ne bénéficiant pas d'une expression exclusive sur les cellules tumorales, alors que les antigènes viraux sont exprimés uniquement sur la tumeur, un score relativement faible a été attribué à ce critère. L'AC9 pourrait donc, à première vue, ne pas être l'antigène de choix pour une vaccination anti-tumorale. Cependant, de nombreuses publications se sont intéressées à l'AC9 ces 5 dernières années et ont démontré à la fois qu'elle était surexprimée dans un vaste répertoire de cancers mais aussi qu'elle jouait un rôle des plus important dans la régulation du pH tumoral. Enfin, une étude clinique a démontré le potentiel immunogène de l'antigène AC9 (Uemura et al., 2006) et plusieurs épitopes reconnus par les lymphocyte T cytotoxiques ont été identifiés dans un contexte HLA-A24 et HLA-A2.1 (Uemura et al., 2006; Vissers et al., 1999).

Il semble donc pertinent d'induire une réponse immune dirigée contre l'AC9, tout particulièrement dans le carcinome rénal à cellules claires, où on observe une surexpression de la protéine de manière constitutive à la surface des cellules tumorales, alors qu'on ne la retrouve pas dans le tissu sain adjacent. Le carcinome rénal à cellules claires (CRcc) représente 85% des cas de cancer du rein (Rini et al., 2009) et est d'une évolution extrêmement variable, avec un tiers des cas se révélant d'emblée sous une forme métastatique. De plus, un élément venant renforcer l'intérêt de développer une immunothérapie active dans le carcinome rénal est l'observation d'une fréquence plus élevée de rémission spontanée pour ce type de cancer. En effet, il est décrit dans la littérature de nombreux cas de régression spontanée de carcinomes rénaux localisés ou métastatiques, conséquences d'une réponse du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Le carcinome rénal est une tumeur immunogène, pour laquelle on observe d'ailleurs un taux de réponse de 15% dans les cas métastatiques lors d'un traitement à l'IL-2. On peut donc s'attendre à des réponses intéressantes suite à une vaccination anti-tumorale.

Etudes cliniques et précliniques

Deux stratégies de vaccination anti-tumorale ciblant l'AC9 ont été évaluées en essais cliniques de phase I dans le carcinome rénal à cellules claires métastatique $CA9^{+}$ (Bleumer et

al., 2007a; Uemura et al., 2006). Une autre étude de phase I a été récemment initiée et est en cours de recrutement (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01826877*) (Tableau 4).

Investigateur	Début	Patients	Phase	Stade	Stratégies vaccinales	Adjuvant	Résultats	Ref
Nara edical University Hospital, Japon	2002	23	1	CRcc métastatique réfractaire à IL-2 ou IFNα	Injection de 3 peptides épitopes de l'AC9 Contexte HLA-A24	Freund incomplet (Montanide)	3 PR, 6 SD, taux de réponse clinique de 39%. 12 vaccinations requises pour induire une réponse CTL	Uemura et al.
University Medical Center, Nijmegen, Pays-Bas	2002	8			Cellules dendritiques chargées par 2 peptides epitopes de l'AC9 Contexte HLA-A2.1 et HLA-DR	KLH	5 injections n'ont pas permis d'induire une réponse CTL ou une réponse clinique	Bleumer et al.
Jonsson Comprehensive Cancer Center et NCI	2012	en recrutement			Cellules dendritiques autologues transduites par un adénovirus contenant le gène de fusion CA9-GM-CSF (AdGMCAIX)	Non	Fin 2015	NCT01826877

Tableau 4 : Etudes cliniques d'immunothérapie anti-tumorale active achevées ou en cours, dirigée contre l'anhydrase carbonique 9. (clinicaltrial.gov)

Dans l'étude de Uemura et al. en 2006, 23 patients HLA-A24 développant des carcinomes rénaux métastatiques $CA9^+$ réfractaires à IFNα et /ou IL-2 ont été recrutés. Il s'agissait en grande majorité de carcinomes rénaux à cellules claires (21/23) avec métastases pulmonaires et +/- ganglionnaires. Les patients ont été vaccinés toutes les 2 semaines par voie sous-cutanée avec une émulsion de 3 peptides épitopes de l'AC9 associée à l'adjuvant de Freund incomplet (CA9p219-227, p288-296, p323-331). Certains patients ont reçu plus de 50 injections et étaient toujours en vie 3 ans après le début de l'étude. Globalement les vaccinations ont été bien tolérées sans effet indésirables majeurs. La plupart des patients ont développé une réponse CTL spécifique des peptides CA9p219-227 et CA9p288-296 entre la $6^{ème}$ et la $9^{ème}$ injection et cette réponse s'est amplifiée avec les injections suivantes. 3 patients avec de multiples métastases pulmonaires ont montré des réponses partielles avec une disparition de certaines lésions. Enfin une stabilisation de la tumeur d'une durée supérieure à 6 mois a été observée sur 6 patients, et la médiane de survie de tous les patients à partir du recrutement était de 21 mois (entre 5 et 35 mois) (Uemura et al., 2006). L'équipe d'Uemura avait préalablement démontré l'immunogénicité d'un peptide épitope de l'AC9 humaine chez la souris Balb/c ($H2K^d$), épitope qui avait aussi une affinité pour HLA-A24 (Shimizu et al., 2003).

L'étude de Bleumer et al. a été réalisée sur 8 patients HLA-A2.1 et HLA-DR+ porteurs de carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques $CA9^+$ (multiples métastases), réfractaires aux traitements par l'IL-2 ou IFNα ou Mab WX-G250. Le traitement consistait à effectuer 5 injections intradermiques de cellules dendritiques autologues activées et chargées par la protéine KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*) associée au peptide épitope restreint au HLA-

A2.1 CA9p254-262 et au peptide épitope restreint au HLA-DR CA9p249-268. L'épitope HLA-A2.1 CA9p254-262 a été identifié dans une étude précédente qui avait démontré que ce peptide était capable d'induire une réponse CTL *in vitro* vis-à-vis de cellules tumorales exprimant l'AC9 (Vissers et al., 1999). Aucune toxicité n'a été observée. Cependant, les essais d'immunomonitoring ont démontré qu'il n'y avait pas de réponse spécifique de l'AC9 et aucune réponse clinique n'a été décrite (Bleumer et al., 2007a).

Enfin un essai de phase I recrute actuellement des patients atteints également de carcinomes rénaux à cellules claires métastatiques $CA9^{+}$. Les patients reçoivent 3 injections intradermiques, espacées de 15 jours chacune, de cellules dendritiques autologues transduites par un adénovirus portant un gène de fusion GM-CSF-CA9 (AdGMCAIX). Plusieurs études *in vitro* sur des échantillons provenant de patients et *in vivo* chez la souris ont démontré l'intérêt de cette approche pour induire une réponse CTL et CD4+ T helper dirigée contre l'AC9 (Birkhäuser et al., 2013; Hernández et al., 2003; Mukouyama et al., 2004; Tso et al., 2001).

Aucune toxicité hépatique ou contre un autre tissu sain connu pour exprimer l'anhydrase carbonique 9 n'a été décrite dans ces différentes études cliniques de vaccination anti-tumorale.

Quelques autres approches de vaccinations ont également été testées en modèle précliniques chez la souris Balb/c. L'AC9 a été couplée à la protéine *heat shock 110* (hsp110) et la réponse immune, ainsi que l'efficacité prophylactique et thérapeutique de ce complexe, ont été évaluées dans un modèle hétérotopique de carcinome rénal (Renca-AC9) sous-cutané (Kim et al., 2007a). La vaccination AC9+hsp110 prévient le développement de la tumeur et produit une réponse IFNγ spécifique mesurée par ELISPOT, ainsi qu'une réponse anticorps spécifique mesurée par ELISA. Enfin en schéma d'injection thérapeutique, la vaccination ralentit la croissance tumorale.

De manière similaire cette même équipe a proposé une vaccination composée d'un complexe d'AC9 (*crosslink*) et démontré qu'il améliorait la réponse immune détectée par ELISpot et dans des essais de cytotoxicité (Wang et al., 2010). Enfin 3 injections du vaccin avant implantation de la tumeur permettaient de ralentir nettement la croissance tumorale.

Enfin Dendreon Corporation (à l'origine du Provenge®), dont la technologie consiste à charger avec l'antigène et faire maturer des cellules dendritiques autologues *ex vivo* avant de les réinjecter au patient, a récemment initié un nouveau programme avec l'AC9

(http://www.dendreon.com/research-development/ACIproductcandidate). Ce nouveau produit est en développement préclinique pour le traitement du cancer du rein, du colon et du col de l'utérus.

PRESENTATION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

CONTEXTE

Un des obstacles pouvant entraver le développement clinique de la technologie BacVac® est le risque d'infection et/ou de dissémination environnementale lié à l'utilisation d'une bactérie vivante atténuée, en particulier chez des patients porteurs d'un cancer. Bien qu'un travail important ait déjà été réalisé sur la souche vaccinale pour développer une bactérie à faible risque infectieux dont l'efficacité anti-tumorale était conservée, nous avons envisagé d'appliquer une nouvelle approche de sécurisation permettant d'abolir la réplication bactérienne tout en conservant l'efficacité vaccinale.

OBJECTIFS

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'une part de mettre au point une souche *P. aeruginosa* « *Killed But Metabolically Active* » (KBMA), répondant au besoin du laboratoire en termes de « sécurisation » et d'efficacité anti-tumorale et, d'autre part, de caractériser la réponse immune obtenue *in vitro* et *in vivo* avec ce nouveau vecteur.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'efficacité respective soit de la souche vivante atténuée (OST) soit de la souche tuée mais métaboliquement active en terme d'infiltration tumorale des lymphocytes T et de la réponse T CD8+ mémoire en utilisant le modèle antigénique OVA. Enfin notre dernier objectif a été de mettre au point une immunothérapie anti-tumorale avec le vecteur BacVac dirigée contre un antigène associé aux tumeurs : l'anhydrase carbonique 9 (AC9). L'AC9 est surexprimée dans de nombreux cancers solides et paraît être une cible à fort potentiel. Plusieurs souches vaccinales capables de produire et injecter différentes séquences antigéniques de l'AC9 humaine ont été développées et un modèle murin de mélanome exprimant l'AC9 humaine a été mis au point au cours de ce travail pour étudier l'efficacité des différentes souches *in vivo*.

RESULTATS

PARTIE I

MISE AU POINT ET DEVELOPPEMENT D'UN VECTEUR *P. aeruginosa* « *Killed But Metabolically Active* » : UNE STRATEGIE SURE POUR DELIVRER DES ANTIGENES PROTEIQUES *IN VIVO* DANS UN OBJECTIF D'IMMUNOTHERAPIE.

PUBLICATION N° 1

Le Gouëllec A, Chauchet X, Laurin D, Aspord C, Verove J, Wang Y, Genestet C, Trocme C, Ahmadi M, Martin S, Broisat A, Cretin F, Ghezzi C, Polack B, Plumas J, Toussaint B. **A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy**. *Molecular Therapy*. 2013 May ; 21(5): 1076-86.

A. OBJECTIFS ET CONTRIBUTION AUX TRAVAUX

Pour rappel, ce travail a eu pour objectif de développer un nouveau vecteur bactérien *P.aeruginosa Killed But Metabolically Active,* capable de délivrer un antigène par le SST3 et de générer une réponse immune chez l'hôte, mais dont le risque infectieux et la capacité de dissémination dans l'environnement ont été abolis. Le concept des pathogènes KBMA a été introduit précédemment et consiste à bloquer la réplication bactérienne par un traitement photochimique, tout en conservant une expression fonctionnelle du génome, du transcriptome et du protéome de la bactérie. Plusieurs applications en vaccination anti-infectieuse ou anti-tumorale ont été explorées à partir de bactéries pathogènes, dont *Listeria*, *Salmonella* et *Bacillus anthracis* (Dubensky et al., 2012).

Ma contribution dans ce travail a été de produire dans un premier temps une souche mutante *P. aeruginosa* OST*ΔuvrAB,* permettant d'inactiver l'enzyme exonuclease ABC (et par conséquent la voie NER, *Nucleotide excision repair*) et rendant impossible la réparation de lésions UV-induite de l'ADN par la bactérie. Par la suite j'ai pu effectuer la mise au point du traitement photochimique sur cette nouvelle souche mutante et l'optimiser afin de conserver une activité métabolique (évaluée sur la capacité de la bactérie à produire et sécréter une protéine via le SST3) tout en inactivant sa réplication. Enfin, j'ai également initié les essais de toxicité et d'efficacité du vecteur KBMA *in vitro* et *in vivo* en modèle tumoral de mélanome B16-OVA.

Une description de la technique de biologie moléculaire utilisée pour élaborer la souche mutante *ΔuvrAB* et la mise au point du traitement photochimique, peu détaillées dans l'article, sont présentées ci-dessous.

B. MATERIEL ET METHODES

I. Mutagenèse par échange allélique basée sur le système de recombinaison Cre-Lox

Cette méthode développée au laboratoire par L. Quénée et le Pr. B. Polack permet la mutation successive de différents gènes (Quénée et al., 2005). Cette technique consiste à inactiver un gène d'intérêt par échange allélique, le remplacer par une séquence d'ADN codant un marqueur de sélection (gentamicine dans le cas présent), puis d'exciser le marqueur de sélection grâce à l'utilisation de séquences flanquantes de type *lox*, ce qui permet des inactivations de gènes ultérieures. Les mutants OSTΔ*uvrA* puis OST*ΔuvrAB* ont été générés successivement à partir de la souche de *P. aeruginosa* atténuée OST (souche CHA délétée pour les gènes codant les exotoxines ExoS et ExoT et la protéine chaperonne Orf1) produite lors de travaux antérieurs.

- Elaboration du plasmide d'échange allélique

Le plasmide PEX100Tlink (Figure 25) possède un site de clonage avec différents sites de restriction ainsi que 2 gènes de sélection conférant à la fois une résistance à l'ampicilline (*bla*) et une sensibilité au saccharose (*sacB*) aux bactéries transformées. Une origine de réplication est uniquement présente pour la bactérie *E.coli* et a été volontairement supprimée pour *P. aeruginosa* (vecteur « suicide »).

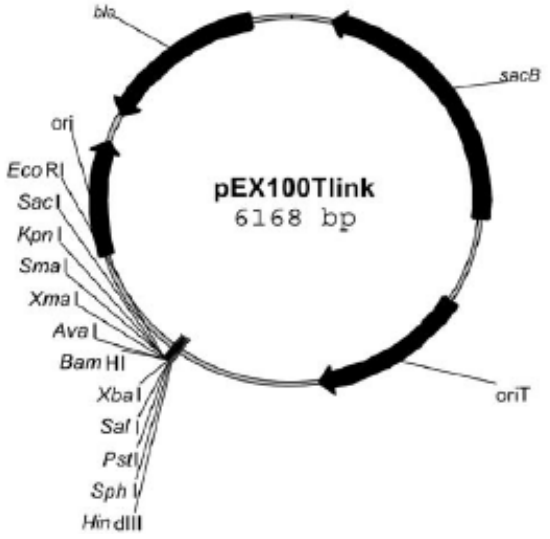


Figure 25 : Plasmide de mutagenèse pEX100Tlink. *Bla3 (β-lactamase de type 3)* code la résistance à l'ampicilline et à la carbenicilline. Le gène *sacB* confère à la souche une sensibilité à un métabolite toxique du sucrose lorsque la souche croît sur milieu LB-sucrose 5%. *oriT* est l'origine de transfert et *ori* correspond à l'origine de réplication du vecteur chez *E. coli*.

En pratique, il faut définir la séquence que l'on souhaite éliminer du génome de la bactérie. On amplifie alors des fragments de 1000pb environ correspondant aux régions flanquantes en amont et en aval du gène d'intérêt. Ces séquences sont amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique à l'aide des amorces décrites dans le tableau 5. Les amorces ont été conçues à partir du génome de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 (AE004740) publié dans la base de données www.*pseudomonas.com* (Stover et al., 2000). La souche PAO1 est génétiquement très proche de la souche CHA que nous utilisons au laboratoire.

Gène	Sens de l'amorce	**Séquence de l'amorce**	
		Région flanquante en 5' du gène	Région flanquante en 3' du gène
uvrA	Sens	GTAAGCTTGCCGAGATGCCCCAGTCGCA	CTGAATTCGGCCCCCCTCGTGCACCAGT
	Antisens	CTGAATTCGGCGGACCACTGGAACCACC	GTAAGCTTGCGCCCCACGAATCAGGATC
uvrB	Sens	GAATTCGCGCAGCGTCTGGATCT	AAGCTTGTTGTTGTTGCGCAGGTA
	Antisens	AAGCTTCATCGAGCAGGTGGTGCG	GGATCCTTGGCGTCACAGCTCC
Gène	Sens de l'amorce	**Séquence de l'amorce**	
uvrA contrôle	Sens	CCTCATGGAAGAAACCGCTG	
	Antisens	CTGAATTCGGCGGACCACTGGAACCACC	
uvrB contrôle	Sens	AGGGTAGTCACCAGCACCC	
	Antisens	GATGTGATCGACATCTTCCC	

Tableau 5 : Amorces pour l'amplification des séquences utilisées pour la délétion des gènes *uvrA* et *uvrB* et pour la contrôle des mutants obtenus.

Les séquences sont insérées (en respectant l'ordre des séquences observé sur le génome de la bactérie) dans le plasmide pEX100Tlink. Enfin la séquence du gène de résistance à la gentamicine *aacC1*, encadrée des deux séquences *lox* reconnues par la recombinase Cre, est insérée entre les 2 fragments. On obtient ainsi les plasmides pEX100T mut *uvrA* et pEX100T mut *uvrB.* Après transformation dans les bactéries compétentes *E.coli* DH5α, les souches positives sont sélectionnées par gentamicine sur milieu LB solide et les plasmides contrôlés par digestion enzymatique suite à une extraction d'ADN plasmidique.

- Description de la conjugaison biparentale avec le plasmide pEX100T mut *uvrA*

L'introduction du plasmide dans la souche OST se fait ensuite par conjugaison biparentale avec une souche d'*E. coli* S17-1 transformée par le plasmide pEX100T mut *uvrA*. Pour ce faire, les souches OST et *E. coli* S17-1 pEX100T mut *uvrA* sont cultivées séparément en milieu LB et LB-Gm respectivement, jusqu'en phase de croissance exponentielle, puis un

mélange des 2 cultures (50µL de chaque) est déposé sous forme de goutte sur un milieu solide LB sans NaCl (favorise la conjugaison).

Après 24h, la culture obtenue est prélevée et reprise dans 1ml de milieu LB. Enfin 100µL de cette suspension sont étalés sur milieu solide PIA-Gm puis incubés O/N à 37°C. Seules les clones OST qui ont reçu le plasmide PEX100T mut *uvrA* lors de la conjugaison pourront croître sur le milieu PIA-Gm. Cependant il peut se produire une simple ou double recombinaison lors de l'échange allélique.

- Sélection des doubles recombinants

Les colonies ayant réalisé une simple ou double recombinaison sont ensuite sélectionnées et repiquées sur milieu PIA-Gm, PIA-sucrose 5% et PIA-Cb.

En cas de simple recombinaison, seule une des deux régions flanquantes a fait l'objet d'une recombinaison, avec deux conséquences :

- La séquence du plasmide est incorporée au chromosome, y compris les séquences *sacB* et *bla3* (conférant une résistance à la carbenicilline et une sensibilité au sucrose 5%)
- La séquence du gène non muté est toujours sur le chromosome.

En cas de double recombinaison, l'échange allélique est obtenu sur les deux régions flanquantes, et la séquence cible a été excisée et remplacée par le gène de résistance à la gentamicie flanquée des 2 séquences *lox*.

Seuls les mutants Gm^r, Cb^s, $Sucrose^r$, correspondants aux double-recombinants sont conservés. Une PCR sur ADN génomique est réalisée systématiquement afin de valider le double-recombinant obtenu.

- Suppression de la résistance à la gentamicine

Le mutant a intégré dans son génome la cassette de résistance à la gentamicine *aacC1* flanquées des séquences *lox* « en remplacement » du gène d'intérêt (Figure 26). Afin de ne pas conserver une souche résistante à la gentamicine, le plasmide pCM157 (Marx and Lidstrom, 2002) est intégré dans la souche mutée par électroporation. Ce plasmide contient les gènes de résistance à la tétracycline et le gène codant la recombinase Cre. Cette enzyme effectue une recombinaison entre les séquences *lox* permettant de supprimer le gène *aacC1* et donc de perdre la résistance à la gentamicine (Figure 26). Les bactéries transformées par ce plasmide sont sélectionnées O/N sur PIA-Tc puis cultivées en milieu LB liquide 48h O/N et

O/D avec un repiquage toutes les 12 heures afin de favoriser la perte du plasmide pCM157 (conférant une résistance à la tétracycline). Enfin une PCR sur ADN génomique est effectuée ainsi qu'une culture en milieu LB-Gm (où rien ne doit pas pousser) pour « valider » le mutant.

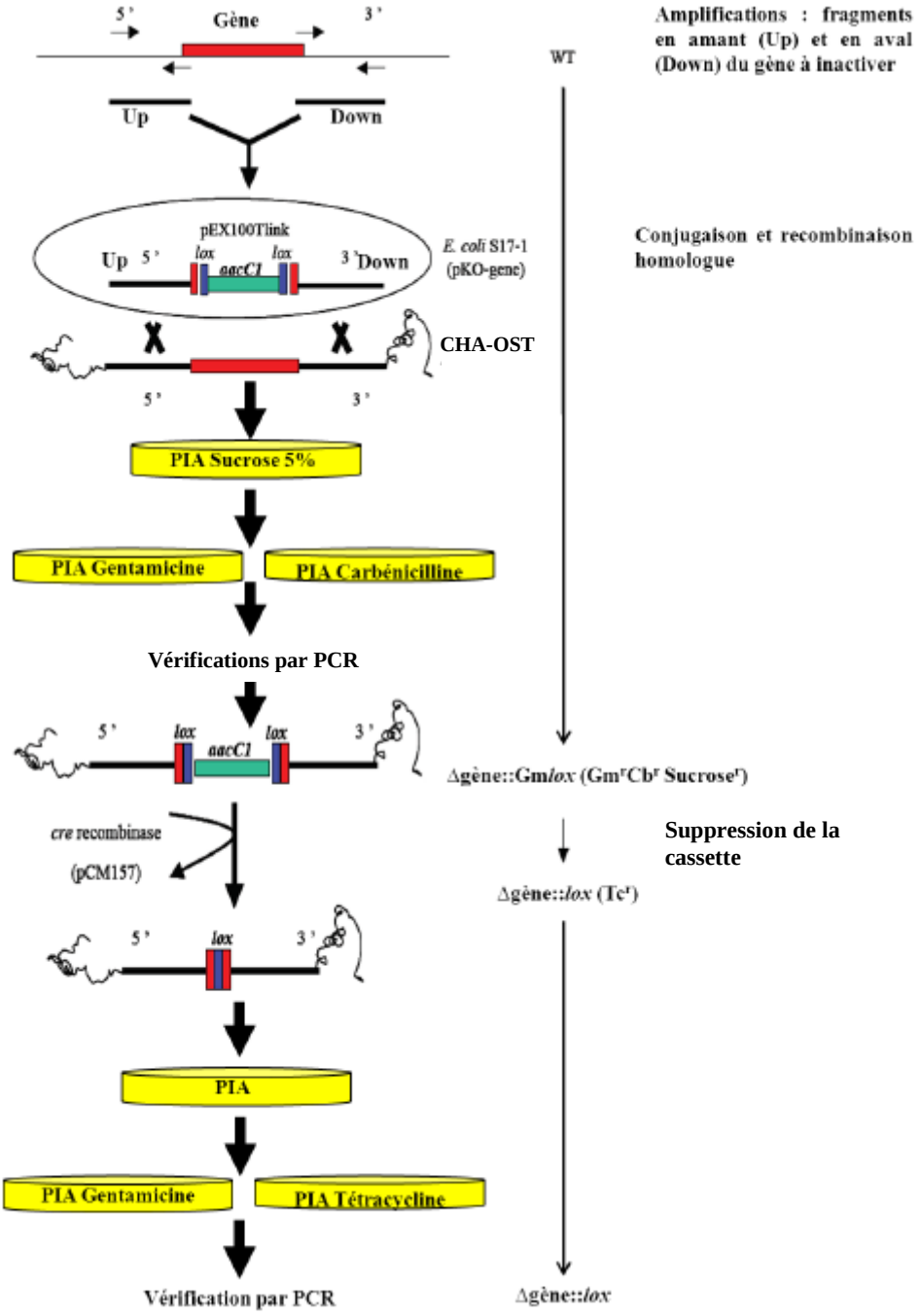


Figure 26 : Mutagenèse par échange allélique et élimination du marqueur de sélection. L'échange allélique conduit à une insertion de la cassette de résistance à la gentamicine *aacC1* flanquée des séquences lox dans le génome de la bactérie. La suppression de cette cassette de résistance est ensuite effectuée par l'introduction du plasmide pCM157 exprimant la Cre recombinase. La méthode peut ainsi être utilisée plusieurs fois pour produire différentes délétions de gènes.

Cette mutagénèse a pu alors être répétée pour le gène *uvrB*.

II. Mise au point du traitement photochimique (PCT) pour obtenir la souche *P. aeruginosa* KBMA

Des pontages covalents (irréversibles pour la souche mutante) vont se former de manière aléatoire entre les bases pyrimidiques de l'ADN bactérien lors de l'exposition au PCT qui associe l'amotosalène (psoralène S-59, Intercept Blood System®, Cerus corporation) à une exposition aux UV de grandes longueurs d'onde (UVA : 320-400 nm) (Brockstedt et al., 2005).

Les bactéries sont mises en culture la veille à 37°C sous agitation dans du milieu LB puis diluées le lendemain dans LB à une DO_{600} = 0,2. A DO_{600nm} de 0,5, une concentration déterminée d'amotosalène est ajoutée puis les bactéries sont à nouveau cultivées jusqu'à DO_{600nm} de 1.

On transfère ensuite 1ml de culture dans une plaque de culture cellulaire 6 puits (Greiner Bio one®) que l'on expose aux UVA à l'aide d'un crosslinker Bio-link® (Vilber Lourmat). Afin de déterminer le traitement optimal, les cultures sont exposées à différentes énergies (en joules/cm²) et plusieurs concentrations d'amotosalène.

Les bactéries sont finalement centrifugées puis lavées par du milieu LB. On dépose différentes dilutions sur milieu PIA O/N à 37°C pour déterminer le nombre de colonies/ml, correspondant au nombre de bactéries résiduelles ayant conservé une activité réplicative après traitement photochimique.

C. RESULTATS

I. Elaboration des mutants CHA-OST Δ*uvrA et* Δ*uvrAB*

Seule la description de la déletion du gène *uvrA* est présentée ici à titre d'exemple.

Les différentes étapes de production du mutant OST*ΔuvrA* ont été validées par PCR, à l'aide d'amorces contrôles situées de part et d'autres du gène *uvrA* (tableau 5), sur ADN génomique (Figure 27) :

1. Amplification d'un fragment de 3936pb pour la souche sauvage (*WT*) CHA-OST
2. Mutant CHA-OST*ΔuvrA* non curé de la cassette de résistance à la gentamicine (Gm^R), caractérisé par une amplification de 2257pb
3. Mutant final CHA-OST*ΔuvrA* curé de la cassette de résistance à la gentamicine (Gm^S), défini par un fragment de 1455pb

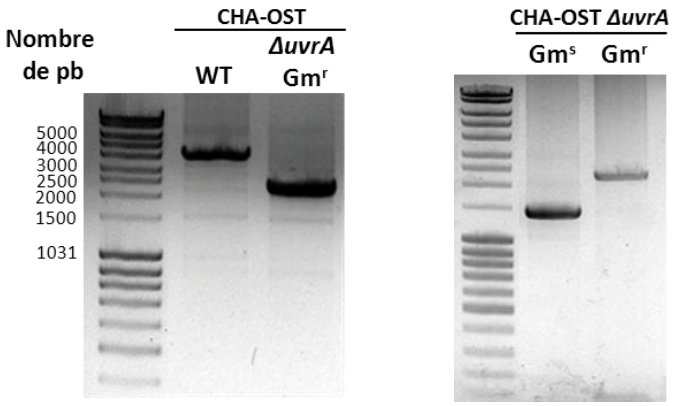


Figure 27 : Analyse génotypique du mutant CHA-OST*ΔuvrA* en comparaison avec la souche sauvage. PCR de contrôle sur ADN génomique puis migration du produit de PCR sur gel d'agarose. Identification génotypique du mutant *ΔuvrA* délété pour la cassette de résistance à la gentamicine. *WT : wild-type*

Nous avons contrôlé et validé que la déletion *ΔuvrA* n'affectait pas la cinétique de croissance des bactéries en milieu liquide ainsi que le phénotype des colonies en milieu solide (résultats non illustrés).

II. Mise au point du traitement photochimique

La sensibilité du mutant au PCT a été déterminée en faisant varier à la fois l'énergie d'exposition aux UVA et la concentration d'amotosalène dans le milieu de culture. Ce traitement ayant déjà été optimisé pour la bactérie Gram-négatif *Salmonella typhimurium ΔuvrAB,* nous avons exposé les souches de *P. aeruginosa* OST et OST*ΔuvrAB* avec un PCT identique (Lankowski and Hohmann, 2007).

La réponse au PCT est évaluée par comptage des CFU/ml résiduelles après dépôt sur milieu PIA (spécifique à *Pseudomonas*) et culture O/N à 37°C. Les bactéries non exposées au PCT sont étalées également sur milieu PIA. Des dilutions sont effectuées avant dépôt en tenant compte des résultats obtenus lors des premiers essais de PCT, de manière à pouvoir dénombrer facilement les colonies (Figure 1b de l'article ci-dessous).

On observe une corrélation entre l'inactivation de la réplication bactérienne et la concentration d'amotosalène utilisée pour le PCT. La dose la plus faible pour obtenir une inactivation complète de la réplication est évaluée à environ 10µM d'amotosalène pour une exposition aux UVA de 7,2 J/cm^2. En comparaison, à cette concentration, 10^7 bactéries sont encore capables de se répliquer pour la souche OST, ce qui montre l'efficacité du PCT sur la souche *P. aeruginosa* OST*ΔuvrAB* pour laquelle on dénombre seulement 1 colonie et confirme l'inactivation de l'exonuclease ABC et du système NER.

D. DISCUSSION

Initialement, nous avons été surpris par la concentration d'amotosalène 10 à 50 fois supérieure à celle utilisée sur les souches *Salmonella typhimurium ΔuvrAB* et *Listeria monocytogenes ΔuvrAB* (respectivement 1,5µM et 200nM d'amotosalène, pour une même exposition aux UVA) pour obtenir une bactérie KBMA (Brockstedt et al., 2005; Lankowski and Hohmann, 2007). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que, contrairement aux espèces précédentes, *P. aeruginosa* est une bactérie de l'environnement. Cette espèce est donc exposée aux rayonnements UV et bénéficie certainement d'une protection accrue contre les lésions UV-induites. Cette hypothèse est à corréler aux données obtenues par Cerus Corporation sur l'étendue de l'inactivation de *P. aeruginosa* par INTERCEPT Blood System® (Tableau 3 en Introduction). En effet, *P. aeruginosa* (souche sauvage) est nettement moins sensible au PCT à 150µM d'amotosalène (réduction du nombre de bactéries réplicatives de 4,5 $\log_{10}$) que *Salmonella enterica* sérotype *choleraesuis* ou *Listeria monocytogenes* (réduction >6.2 $\log_{10}$). De plus, dans l'étude de Brockstedt *et al.*, un PCT à 2µM d'amotosalène et 7,2J/cm² est suffisant pour abolir la réplication **d'une souche sauvage** de *Listeria monocytogenes*, démontrant la sensibilité élevée de cette espèce au PCT (Brockstedt et al., 2005).

Il pourrait donc être nécessaire et logique d'appliquer un PCT plus robuste aux mutants *Pseudomonas ΔuvrAB* pour obtenir le même effet que sur d'autres espèces bactériennes. Cependant il y a toujours un risque de créer de nombreux pontages d'amotosalène dans l'ADN, en utilisant des concentrations plus élevées, pouvant être délétère à la conservation de l'activité métabolique de la souche, et également à l'expression de la protéine de fusion située sur la construction plasmidique pEAiS54. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir réaliser l'expérience effectuée par Brockstedt *et al.* qui consiste à marquer l'amotosalène au carbone 14 puis à exposer les bactéries au PCT à différentes concentrations et enfin isoler l'ADN génomique pour en mesurer la radioactivité. La connaissance du nombre de molécules d'amotosalène utilisées par rapport à la concentration d'ADN permet de déterminer la fréquence des pontage dans l'ADN bactérien (Brockstedt et al., 2005).

original article

© The American Society of Gene & Cell Therapy

A Safe Bacterial Microsyringe for *In Vivo* Antigen Delivery and Immunotherapy

Audrey Le Gouëllec[1,4], Xavier Chauchet[1], David Laurin[1,2], Caroline Aspord[2,3], Julien Verove[6], Yan Wang[1], Charlotte Genestet[1], Candice Trocme[4], Mitra Ahmadi[5], Sandrine Martin[5], Alexis Broisat[5], François Cretin[6], Catherine Ghezzi[5], Benoit Polack[1,7], Joël Plumas[2,3] and Bertrand Toussaint[1,4]

[1]*TIMC-TheREx Laboratory (UMR 5525 CNRS-UJF), Faculty of Medecine, Université Joseph Fourier Grenoble I, La Tronche, France;* [2]*Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, La Tronche, France;* [3]*INSERM, U823, Immunobiology & Immunotherapy of Cancers, La Tronche, France;* [4]*Biochimie des enzymes et des protéines, Département de Biochimie Toxicologie Pharmacologie, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, Grenoble, France;* [5]*INSERM U1039, Radiopharmaceutiques Biocliniques, Faculté de Médecine de Grenoble, La Tronche, France;* [6]*Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, iRTSV, CEA-Grenoble, Grenoble, France;* [7]*Hémostase et hémolyse, Département d'Hématologie Onco-Génétique et Immunologie, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, Grenoble, France*

The industrial development of active immunotherapy based on live-attenuated bacterial vectors has matured. We developed a microsyringe for antigen delivery based on the type III secretion system (T3SS) of *P. aeruginosa*. We applied the "killed but metabolically active" (KBMA) attenuation strategy to make this bacterial vector suitable for human use. We demonstrate that attenuated *P. aeruginosa* has the potential to deliver antigens to human antigen-presenting cells *in vitro* via T3SS with considerable attenuated cytotoxicity as compared with the wild-type vector. In a mouse model of cancer, we demonstrate that this KBMA strain, which cannot replicate in its host, efficiently disseminates into lymphoid organs and delivers its heterologous antigen. The attenuated strain effectively induces a cellular immune response to the cancerous cells while lowering the systemic inflammatory response. Hence, a KBMA *P. aeruginosa* microsyringe is an efficient and safe tool for *in vivo* antigen delivery.

Received 29 October 2012; accepted 30 January 2013; advance online publication 26 March 2013. doi:10.1038/mt.2013.41

INTRODUCTION

Since William Coley's discovery in the 19th century, bacterial-based cancer treatment has been envisioned.[1] First, the bacteria ability to stimulate the immune system was powerful enough particularly in the bladder cancer treatment with a live Bacillus Calmette–Guerin therapy. Then, more recently, numerous preliminary proof-of-concept experiments demonstrated the vast capacity of bacteria for treating cancer and illustrated the large number of effective tools possessed by these robot factories.[2,3] More precisely, heterologous-antigen-specific bacterial-based vaccine has emerged for active immunotherapy.[4–7] In the preclinical and clinical stages, three virulence-attenuated strains of pathogenic bacteria, *i.e., Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*, have been used for active immunotherapy.[4,8–10] These bacterial vaccines enable the *in vivo* delivery of heterologous antigens and the activation of antigen-presenting cells via their pathogen-associated molecular patterns.

P. aeruginosa possesses a type III secretion system (T3SS), a macromolecular, needle-like apparatus necessary for infection[11] by the injection of exotoxins S, T, and U. Here, we use the OST strain, in which all of the major secreted exotoxins are absent (ExoU), or deleted (ExoS, ExoT), and in which an episomal copy of the ExsA activator of T3SS is under the control of an isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible promoter.[12] This system guarantees the controlled formation of a preassembled needle before bacterial injection into the host (Figure 1a). The first 54 residues of exotoxin S served as secretion tag (S54) to conduct the protein of interest through the T3SS needle and into the cellular cytoplasm, where recombinant protein is processed. Furthermore, it's an attractive strategy for the construction of multivalent vaccine.[13] This T3SS-based vaccination with diverse pathogenic bacteria has been proven effective for priming antigen-specific $CD8^+$ T cells[6,14,15] against a variety of pathogens (including viruses, intracellular bacteria, such as *Listeria*[16–19] and parasites, such as *Schistosoma japonicum*)[20] and for antitumoral immunotherapy purposes.[14,21]

The efficacy of an attenuated vaccine vector relies on a subtle balance between minimal toxicity and maximal stimulation of an immune response. This cornerstone, described by Blanders *et al.*, is fundamental for vaccines.[22] Although auxotrophic strains (in particular, those that are auxotrophic for aromatic amino acids) have been used with several pathogens, including *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, and *Pseudomonas spp*,[23] for the production of live-attenuated vaccine strains,[23–27] single-deletion mutants, such as *aroA* mutants, retain sufficient virulence to make them unacceptable for human vaccines.[28] Moreover, the potential risks of reversion to a virulent state, viability/propagation in environments other than the intestines and unintentional transfer to other individuals[29] are unacceptable. In 2005, Brockstedt *et al.* developed the concept of vaccines that are "killed but metabolically active" (KBMA) using L. *monocytogenes*.[30] The deletion of two *uvr* genes (A and B), coding for Exonucleotidase A and B subunits, renders bacteria sensitive to psoralen-induced crosslinking.[31] In other words, the Δ*uvrAB*

Correspondence: Bertrand Toussaint, Faculty of medicine, TIMC-TheREx laboratory, UMR5525 (CNRS-UJF), Domaine de la merci, 38700 La Tronche, France. E-mail: BToussaint@chu-grenoble.fr

© The American Society of Gene & Cell Therapy

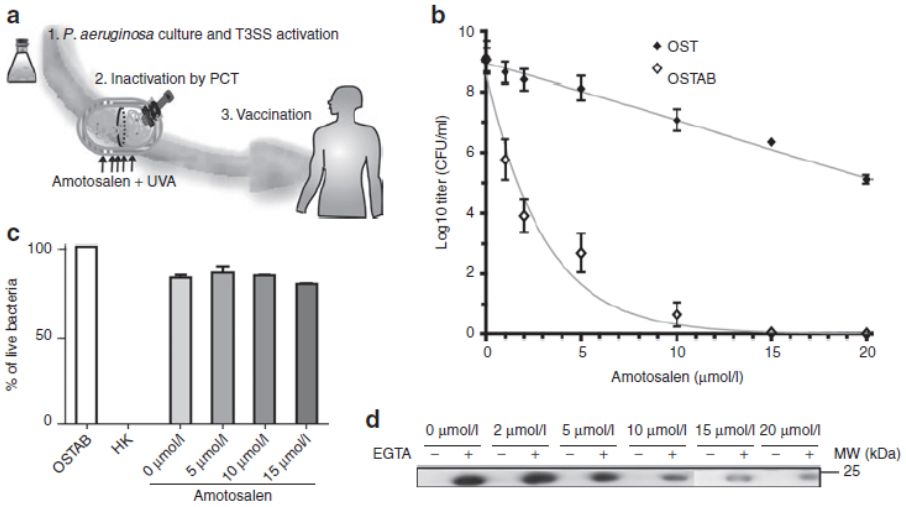


Figure 1 An overview of the *P. aeruginosa* "killed but metabolically active" T3SS-based vaccination. (**a**) The *P. aeruginosa* strain is cultivated under T3SS-inducing conditions. The protein used for vaccination is overexpressed by bacteria before bacterial inactivation with PCT in the presence of amotosalen. Then, *P. aeruginosa* is injected subcutaneously (s.c.), and its active T3SS allows protein injection into the host cells. (**b**) Colony-forming units (CFU) of OST and OSTAB after treatment with increasing amotosalen concentration. The mean of five experiments (performed in duplicate) is represented. (**c**) Analysis of the membrane integrity of the *P. aeruginosa* OSTAB strain with the Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Invitrogen). OSTAB (live), heat-killed (HK), or photochemically treated *P. aeruginosa* in presence of 0–15 µmol/l amotosalen concentrations. (**d**) Western blot analysis of the protein S54-OVA in the supernatant of cultivated OSTAB S54-OVA strain with or without EGTA (*i.e.,* closed or opened syringe), after PCT and in the presence of various amotosalen concentrations. IPTG was added for 3 hours after PCT. Representative blot of three experiments. EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; IPTG, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; PCT, photochemical treatment.

nucleotide excision repair mutants cannot replicate after photochemical treatment (PCT) with a synthetic, highly reactive psoralen known as amotosalen and upon exposure to long-wavelength ultraviolet A (UVA) light because of the presence of infrequent and randomly distributed crosslinks.[32] Recently, this new class of vaccine and its broad applications has been reviewed.[33] However, it is unclear whether this PCT could be applied to *P. aeruginosa* bacteria and whether it preserves T3SS function. To confirm this assumption, we made a Δ*uvrAB* deletion mutant in *P. aeruginosa* (named OSTAB, for description see **Supplementary Table S1**), optimized PCT and studied the capacity of KBMA *P. aeruginosa* to translocate β-lactamase (Bla) proteins into cells via the T3SS. *In vitro*, KBMA *P. aeruginosa* activated human dendritic cells (DCs) and, once activated, the DCs presented an immunogenic peptide to T lymphocytes. Because the KBMA bacteria cannot replicate and induced a lower systemic response than wild type, we sought to characterize the pharmacodynamics of KBMA *P. aeruginosa* in mice. Finally, the KBMA vaccine elicited functional T $CD8^+$ cells in mice, which correlates with efficacy in mouse models of cancer. Taken together, our findings highlight the potential of using a KBMA *P. aeruginosa* microsyringe for *in vivo* antigen delivery, making a step towards a safer vaccine for human use. Furthermore, we provide a promising new therapeutic tool for antigen delivery that stimulates immunity to fight cancer and infectious diseases that are caused by intracellular pathogens.

RESULTS

PCT blocks the replication of an OSTAB mutant without affecting the T3SS

Nucleotide excision repair mutants were obtained by removing the *uvrAB* genes from the *P. aeruginosa* strain by allelic exchange.[34] We determined the relative sensitivity to photochemical inactivation by testing the new OSTAB and its parental strain over a range of amotosalen concentrations and a UVA dose of 7.2 J/cm², using conditions established previously for gram-negative bacteria.[35] As expected, the nucleotide excision repair–deficient strain, OSTAB, was much more sensitive to PCT than OST (**Figure 1b**). With 10 µmol/l of amotosalen, there was ~1 live replicating organism per 1.25×10^8 bacteria for OSTAB compared with 2.5×10^6 live bacteria for OST. Higher doses of amotosalen completely abolished bacterial replication, but the associated high adduct frequency in the genome may interfere with protein production. To determine bacterial viability and membrane integrity of the photochemically treated *P. aeruginosa* OSTAB strain, we used the Live/Dead *Bac*Light assay (Invitrogen, Carlsbad, CA) (**Figure 1c**). After PCT, bacteria were unable to replicate in the nutrient medium, but they may be scored as "alive" due to their intact membranes, contrary to heat-killed (HK) bacteria. An essential feature of the previously described KBMA organisms is their capacity to transcribe and translate antigenic proteins after PCT.[30] As our vaccine is based on antigen injection by the T3SS, we determined the secretion efficiency of a model protein (chicken ovalbumin fragment) fused with S54 (S54-OVA) after PCT with various concentrations of amotosalen (0–20 µmol/l). We assessed the production of secreted S54-OVA into the supernatant of the cultivated strain with or without ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and with IPTG after PCT. Indeed, calcium depletion induced by EGTA triggers T3SS activation in *P. aeruginosa*, along with the secretion of T3SS effectors (or S54-OVA) into the culture medium.[36] The level of secreted S54-OVA decreased when applying high concentrations of amotosalen from 100%

© The American Society of Gene & Cell Therapy

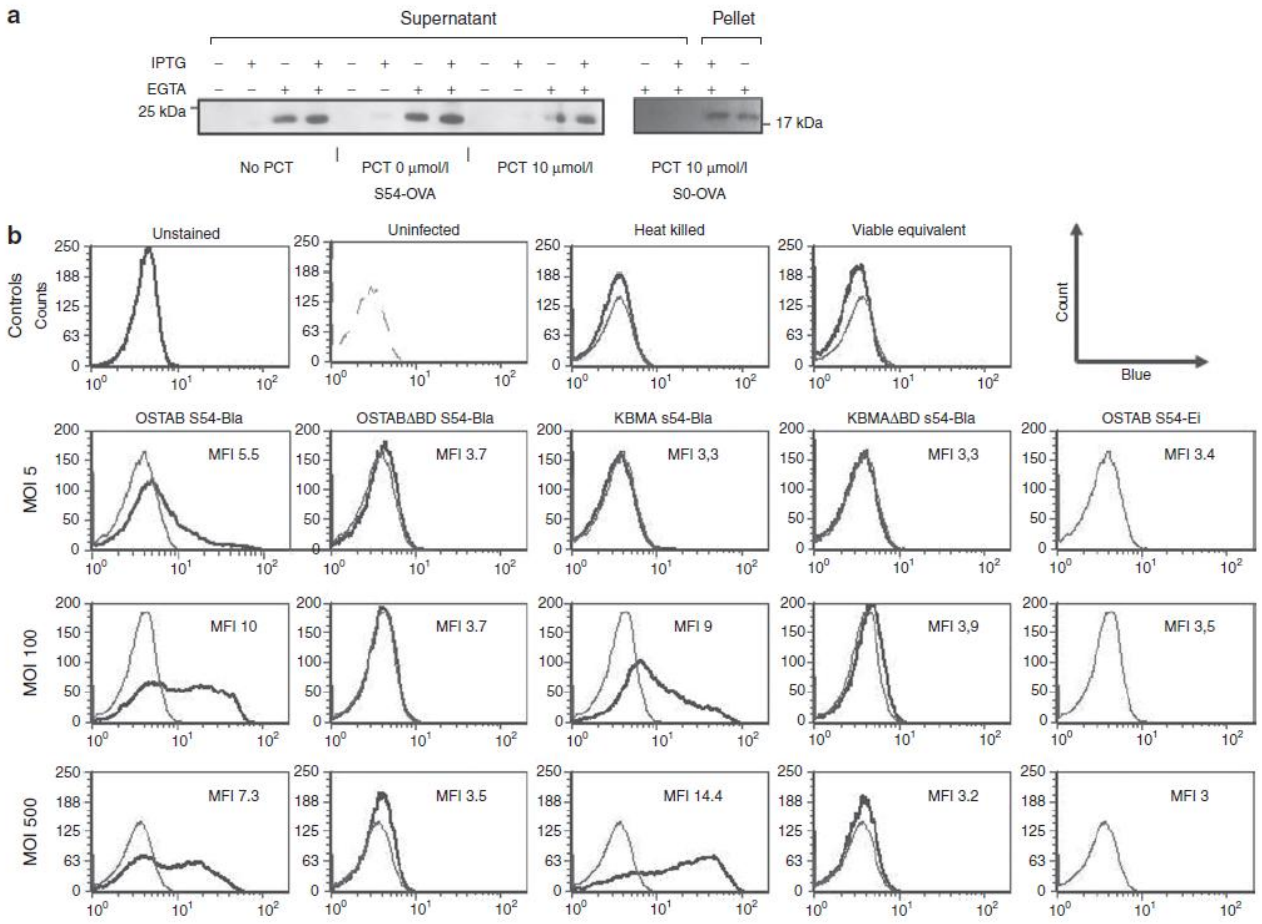


Figure 2 KBMA P. aeruginosa produces, secretes, and injects antigen into cells. (**a**) KBMA *P. aeruginosa* secretes S54-OVA antigen in the culture medium *in vitro*. Bacterial OSTAB S54-OVA were cultivated for 3 hours in the presence or absence of IPTG and EGTA in three different conditions (*i.e.*, No PCT or after PCT with or without 10 µmol/l amotosalen treatment) (**b**) HL60 target cells were infected for 3 hours with OSTAB, OSTAB*ΔpopBD*, KBMA, and KBMA*ΔpopBD* strains with pEiS54 empty (S54-Ei) or associated to the β-lactamase (S54-Bla) at MOIs of 5:1, 100:1, and 500:1. CCF2-AM cleavage by Bla was measured by flow cytometry. Control histograms corresponding to OSTAB S54-Ei for each MOI are represented with thin grey line. A representative of at least three experiments is shown. Mean fluorescence intensity (MFI) is indicated in each panel. EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; KBMA, "killed but metabolically active"; IPTG, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; MOI, multiplicity of infection; PCT, photochemical treatment.

at 0 µmol/l to 30% at 10 µmol/l of amotosalen (relative amount to 0 µmol/l of amotosalen) (Figure 1d). The best compromise between the absence of replication and conserved secretion was observed at 10 µmol/l of amotosalen. Therefore, we applied this condition in the following experiments to obtain a KBMA *P. aeruginosa*.

We then further investigated the T3SS functionality of our KBMA strain vaccine in different growth conditions. IPTG was added before PCT to induce the production of ExsA and, hence, to control the presence of a microsyringe before PCT. When adding IPTG and EGTA to induce secretion (Figure 2a), we recovered S54-OVA protein in the supernatant of the nucleotide excision repair–deficient strain. Using KBMA S0-OVA, expressing a non-secretable form of OVA, there was no S0-OVA in the supernatant, indicating the absence of bacterial lysis with PCT.

To better assess the export of proteins into eukaryotic cells by KBMA *P. aeruginosa*'s T3SS, we used strains that deliver Bla fused to ExoS54 (Figure 2b). HL60 cells were incubated for 3 hours with *P. aeruginosa* strains as previously described.[37] The HL60 cells were then loaded with CCF2-AM (Invitrogen) for 30 minutes. CCF2-AM is a fluorescent substrate of Bla; enzymatic cleavage modifies its emitted fluorescence from green to blue.[37] Flow cytometry analysis revealed intracellular blue fluorescence, indicating increased CCF2-AM cleavage by the injected Bla for the KBMA S54-Bla strain at multiplicity of infections (MOIs) of 100 and 500. No blue fluorescence was observed in cells that were unstained, uninfected or infected with an equivalent dose of viable bacteria (*i.e.*, 1 live replicating bacteria per 1.25×10^8 exposed bacteria corresponds to an MOI of approximately 500) or in strains harboring an empty plasmid (pEi), a T3SS-deficient S54-Bla plasmid (OSTAB*ΔpopBD* S54-Bla) or a KBMA S54-Bla T3SS deficiency (KBMA*ΔpopBD* S54-Bla) (Figure 2b). Taken together, these data demonstrate that the KBMA *P. aeruginosa* obtained after PCT in 10 µmol/l amotosalen was unable to replicate on a nutrient agar medium but produce and inject proteins by T3SS.

© The American Society of Gene & Cell Therapy

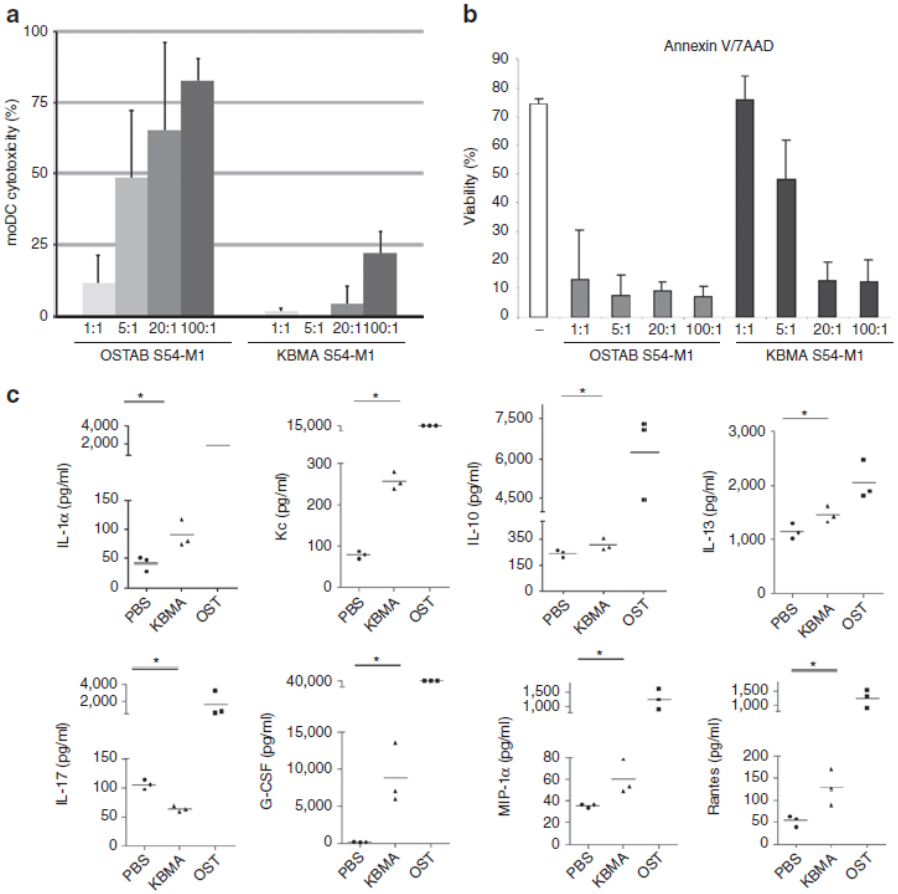


Figure 3 KBMA *P. aeruginosa* is poorly cytotoxic and leads to a mild inflammatory response *in vivo*. (**a**) The cytotoxicity of KBMA *P. aeruginosa* on human moDCs measured by LDH released from dead cells 3 hours after infection at different MOI (1:1; 5:1; 20:1; 100:1) (Mean and SD from five experiments) and (**b**) the viability analyzed by 7AAD/AnnexinV flow cytometry assay 24 hours after infection with increasing MOI (SD from three different donors). The "-" represents not treated cells. (**c**) A multiplex immunoassay was used to determine the expression levels of 23 different cytokines in mouse plasma samples that were obtained 24 hours after vaccination ($n = 3$) with KBMA S54-OVA (triangles) or OSTAB S54-OVA (squares) (5×10^7 bacteria s.c.) versus the phosphate-buffered saline (PBS) control (circles). Only the" cytokines that were significantly different from the control ($^*P < 0.05$) are shown in mice vaccinated with KBMA. The bar represents the mean of the data. KBMA, "killed but metabolically active"; MFI, mean fluorescence intensity; MOI, multiplicity of infection.

The KBMA *P. aeruginosa* vaccine is less toxic for cells and avirulent in mice

DCs are the most potent antigen-presenting cells. They play a crucial role in the initiation and modulation of specific immune responses. Moreover, these cells are particularly sensitive to *P. aeruginosa*.[38] Therefore, we examined the cytotoxicity of KBMA *P. aeruginosa* on DCs. When using human monocyte-derived dendritic cells (moDCs), we observed that live OSTAB kills moDCs in a concentration-dependent manner after 3 hours of coincubation. KBMA is less cytotoxic than a live strain, killing only 17% of cells at its highest MOI (100:1) (Figure 3a). In addition, flow cytometry analysis revealed that OSTAB induced 90% of moDC death (Annexin V^+ and/or $7AAD^+$) 24 hours after infection at all investigated MOIs (Figure 3b). KBMA bacteria is less toxic than live bacteria at lower MOIs, but it killed cells at levels comparable with live bacteria at MOIs greater than 20:1.

To evaluate the toxicity of KBMA *P. aeruginosa in vivo*, we examined the survival of 6-week-old female C57BL/6J mice after a single subcutaneous (s.c.) injection of 5×10^7, 5×10^8 or 5×10^9 bacteria (**Supplementary Table S3**). All of the mice injected with a 5×10^7 dose of OST S54-OVA died within the first 24 hours. No death was observed in the group injected with 5×10^7 KBMA S54-OVA or in groups injected with 5×10^6 bacteria. We then assessed the lethality of the 5×10^8 and 5×10^9 doses of KBMA S54-OVA. One of the three mice injected with a 5×10^8 dose died, and all of the mice died with a 5×10^9 bacterial dose.

A multiplex immunoassay screening for cytokines and chemokines was used to measure the proinflammatory effect of KBMA *P. aeruginosa* vaccinations. Multiplex xMAP technology was performed on mice vaccinated with phosphate-buffered saline (PBS), OSTAB S54-OVA and KBMA S54-OVA (5×10^7 bacteria). Among the molecules analyzed, levels of IL-1α, Kc, IL-13, G-CSF, MIP-1α and RANTES were significantly higher ($P = 0.00495$) in KBMA-vaccinated mice than in PBS-injected animals (Figure 3c). At this dose, all of the cytokines and chemokines analyzed were significantly higher in OSTAB S54-OVA vaccinations than in those with

© The American Society of Gene & Cell Therapy

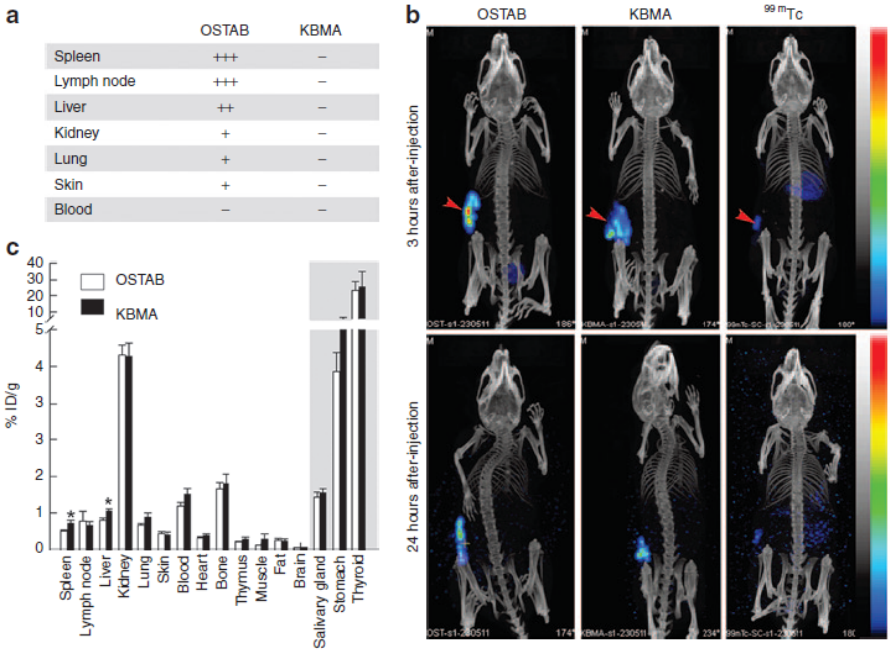


Figure 4 KBMA *P. aeruginosa* dissemination *in vivo*. (**a**) The effect of photochemical treatment on the number of colony-forming units 24 hours after subcutaneous (s.c.) injection of 5×10^7 bacteria. (–) Absence of CFU/ml, (+) ~10^1 CFU/ml, (++) ~10^2 CFU/ml, (+++) >5.10^2 CFU/ml. ($n = 3$ per group) (**b**) Representative SPECT/CT images of 5×10^7 ^{99m}Tc-radiolabeled bacteria 3 hours and 24 hours following s.c. injection in the flank (arrowhead). Free ^{99m}Tc is shown as control. (**c**) Comparison of ^{99m}Tc-labeled OSTAB and KBMA bacteria retrieved from different organs 24 hours following s.c. injection ($n = 6$ mice per group). ID, injected dose; KBMA, "killed but metabolically active."

PBS ($P < 0.005$) and in OSTAB S54-OVA vaccinations than in those with KBMA S54-OVA (**Supplementary Table S4**). Interestingly, IL-17 levels were significantly lower in KBMA-vaccinated mice than in OSTAB- or PBS-vaccinated mice ($P = 0.00495$).

On the basis of the induced systemic responses described, these experiments demonstrate that KBMA S54-OVA bacteria are less toxic and less reactogenic *in vivo* than the OSTAB strain.

KBMA *P. aeruginosa* disseminates in lymphoid organs, similar to the OSTAB strain

As the systemic response decreased after vaccination with the KBMA strain, *P. aeruginosa* dissemination was evaluated following s.c. injection. When live *P. aeruginosa* were injected, bacteria are recovered on *Pseudomonas* isolation agar plates containing gentamicin (guarantying OSTAB Gm^R strain isolation) from various homogenized organs, such as the lymph nodes, spleen, liver, skin, lungs, and kidneys (Figure 4a). In comparison, no replicating bacteria were detected in the animals when they were injected with KBMA *P. aeruginosa*, indicating an irreversible attenuation process following *in vivo* injection. Radiolabeling was employed as an alternative technique to evaluate KBMA dissemination due to its inability to replicate. Live and KBMA bacteria were labeled with ^{99m}Tc to enable their detection with high sensitivity. Bacterial labeling did not modify their replication on agar plates and therefore did not affect the viability of the live strain. As demonstrated by nanoSPECT/CT molecular imaging, a slow dissemination was observed following s.c. injection of 5×10^7 bacteria, with ~85% and 50% of the injected dose remaining at the injection site at 3 and 24 hours after injection, respectively, in both live and KBMA strains. In comparison, free ^{99m}Tc diffused rapidly, with only 3% injected dose remaining at the injection site after 24 hours (Figure 4b). This discrepancy between ^{99m}Tc-labeled bacteria and free ^{99m}Tc diffusion strongly supports the *in vivo* stability of the radiolabeling. However, some free ^{99m}Tc was detected 24 hours after injection of the labeled bacteria, as demonstrated by the activity found in tissues that are known to express the Na/I symporter, e.g., salivary glands, stomach and thyroid (Figure 4c). This activity might be attributed to a loss of ^{99m}Tc from living bacteria or, more likely, to ^{99m}Tc release following bacterial degradation by the immune system. In all other evaluated tissues, comparable dissemination was observed between OSTAB and KBMA strains, with only moderately significant differences (24 and 29%) in the liver and the spleen ($P < 0.05$). Therefore, we conclude that KBMA *P. aeruginosa* dissemination is similar to OSTAB dissemination.

KBMA *P. aeruginosa* activates and injects antigens into human dendritic cells, which then stimulates antigen-specific $CD8^+$ T cells

The DC maturation process coordinates the regulation of antigen processing and presentation, the expression of costimulatory molecules, and the secretion of cytokines that prime $CD8^+$ and $CD4^+$ T-cell responses. We evaluated whether DC maturation occurred when they are exposed to KBMA *P. aeruginosa* delivering the flu M1 antigen. Immature day 5 moDCs displayed typical morphology and an immature phenotype (moderate levels of CD80, CD86, CD40, and CD83) (data not shown). Immature moDCs were incubated for 3 hours with one of three IPTG-induced OSTAB strains: live (MOI 5:1), KBMA (MOI 100:1), or HK (MOI 100:1).

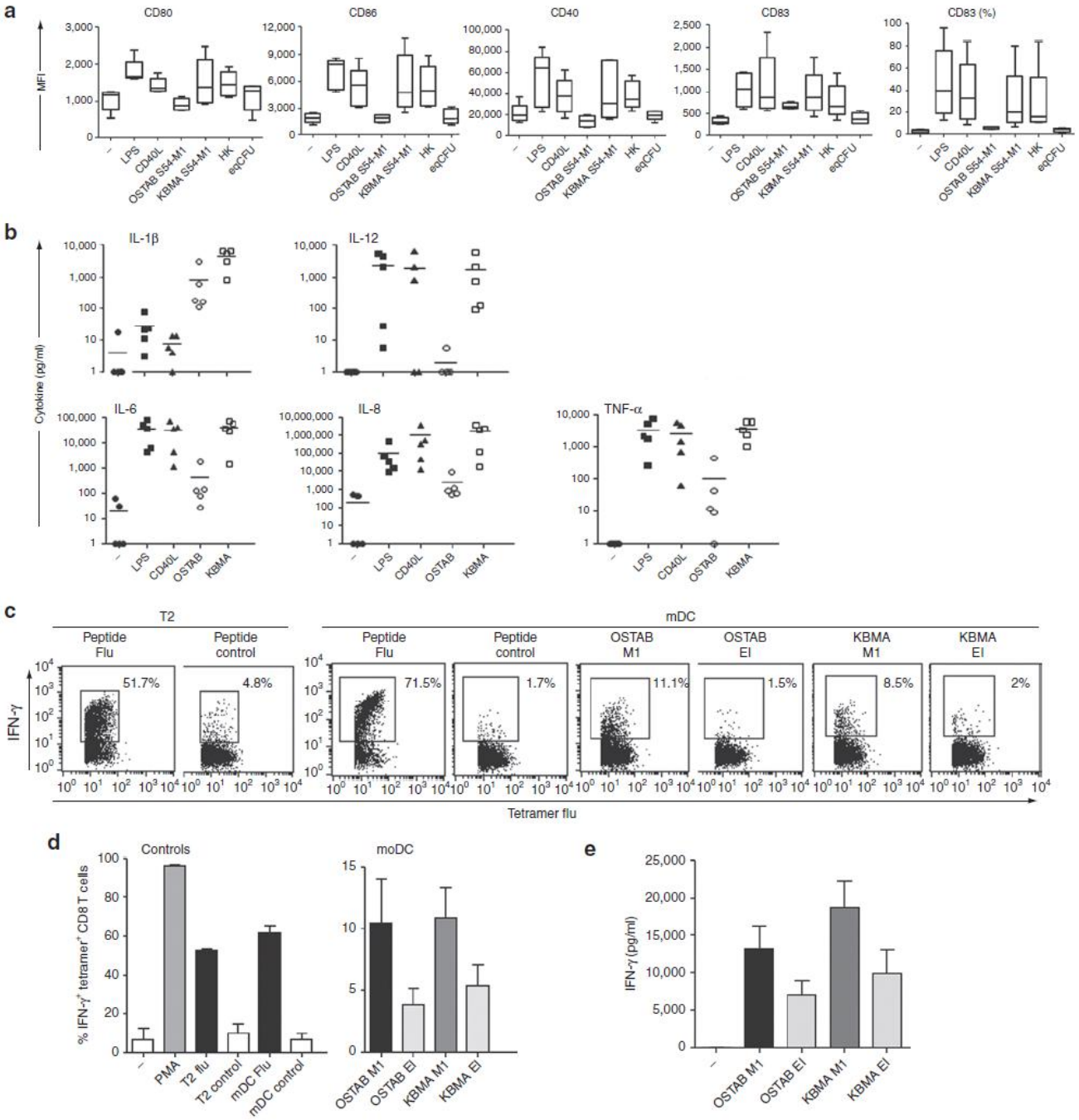


Figure 5 The KBMA *P. aeruginosa* vaccine activates human moDCs and induces antigen-specific CD8$^+$ T-cell responses *in vitro*. (**a**) Expression of the maturation markers (CD80, CD86, CD83, and CD40) on the surface of human moDCs infected with live or KBMA strains, at MOI 100:1. (**a**,**b**) Not treated lipopolysaccharide (LPS) and CD40L were used as controls. (**b**) Cytokine secretion by human moDCs following live-strain and KBMA stimulation (n = 5); (**c**,**d**) Cross-presentation of flu M1 epitope by DCs submitted to OSTAB or KBMA strains assayed by intracellular IFN-γ labeling within tetramer flu-specific CD8+ T cells from cocultures. T2 and mDC loaded with the epitope were used as controls. (**c**) One representative experiment, (**d**) mean of four experiments. (**e**) Cross-presentation of flu M1 epitope by DCs submitted to OSTAB or KBMA strains assayed by IFN-γ measurement in the supernatants of the cultures (n = 5–8 experiments). HK, heat-killed; KBMA, "killed but metabolically active"; MOI, multiplicity of infection.

Functional features were assessed 24 hours later. Phenotypic analysis revealed that stimulation with both the KBMA S54-M1 and HK S54-M1 strains led to increases in the surface expression levels of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) and maturation-associated (CD83) molecules (Figure 5a). The degrees of upregulation were comparable with the activation induced by the controls (lipopolysaccharide and CD40L). We did not observe upregulation of CD80, CD86, CD40, and CD83 with live strain (OSTAB S54-M1) or equivalent live bacteria (eqCFU) but probably due to cytotoxicity effect at early stage of injection.

We have analyzed whether the tested strains induce cytokine secretion by moDC. KBMA *P. aeruginosa* and the positive controls

© The American Society of Gene & Cell Therapy

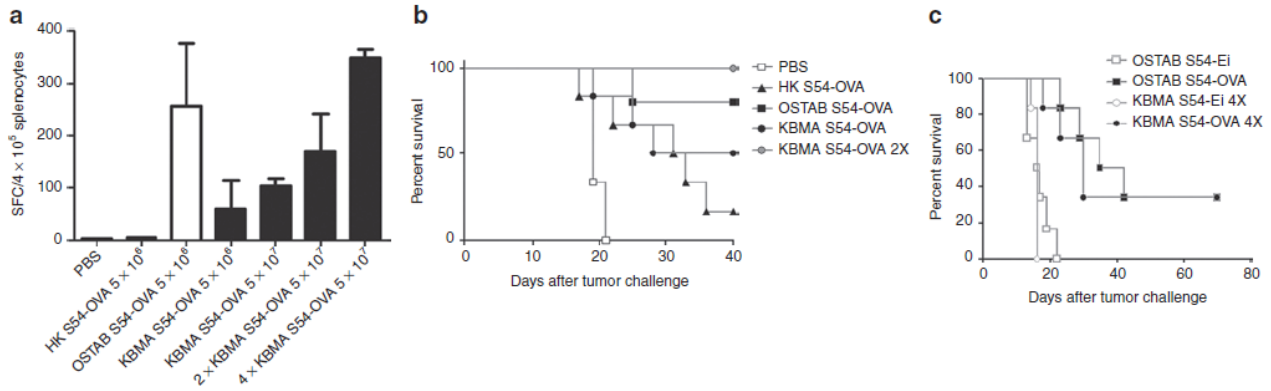


Figure 6 The KBMA *P. aeruginosa* immunotherapy stimulates the production of specific lymphocyte CD8$^+$ T cells *in vivo* and prolongs survival of mice bearing B16-OVA tumor. (**a**) The average number of spot-forming cells (SFC) per 4×10^5 splenocytes of mice subcutaneous (s.c.) injected with phosphate-buffered saline (PBS), heat-killed (HK) S54-OVA, OSTAB S54-OVA, or KBMA S54-OVA strains at 5×10^6, 5×10^7, 2X 5×10^7, or 4X 5×10^7 bacteria. Mice were s.c. injected on day 14 and 7 in the right flank (1X vaccination), in the right and left flank (2X vaccinations), and in the right and left flanks and the right and left shoulders (4X vaccinations) with 5.10^7 KBMA S54-OVA bacteria/injection site. ELISpot was used as indicated by the manufacturer. The results presented are the means of three independent experiments. (**b**–**c**) C57BL/6J mice received s.c. B16-OVA tumor cells (2×10^5 cells) on day 0. (**b**) The survival curves of PBS-treated control mice and mice that were prophylactically vaccinated on 14 and 7 days in the right flank with OST S54-OVA (5×10^6), KBMA S54-OVA (5×10^7 in one or two sites of injection), and HK OSTAB S54-OVA (5×10^7). Log-rank test, KBMA S54-OVA 2X versus PBS, $P = 0.0006$. (**c**) The survival curves of mice challenged with B16-OVA and vaccinated sixfold (d+1 and every 4 days) with KBMA *P. aeruginosa* or live strains. Animals were killed when tumor diameters exceeded 10 mm in any dimension for both vaccination schemes. The population size was $n = 6$ per group. Log-rank test, OSTAB S54-Ei 4X versus OSTAB S54-OVA 4X group, $P = 0.0012$. KBMA, "killed but metabolically active."

(lipopolysaccharide and CD40L) induced the secretion of TNF-α, IL-6, IL-8, and IL-12 to comparable levels. KBMA induced higher cytokine secretion levels than the OSTAB strain (Figure 5b), provided the tests were conducted at high MOIs. KBMA induced higher levels of IL-1β than the positive control or the OSTAB strain.

As shown previously by Epaulard *et al.*,[21] recombinant protein injected via *P. aeruginosa*'s T3SS is efficiently processed by the major histocompatibility complex class I pathway. Here, we used OVA-specific CD8$^+$ T-cell hybridoma cells (B3Z)[39] to determine the capacity of primary C57BL/6J mouse BMDCs infected with KBMA *P. aeruginosa* to process and present the immunodominant major histocompatibility complex class I OVA epitope SIINFEKL to CD8$^+$ T-cell hybridoma (**Supplementary Figure S1**). We incubated BMDCs for 3 hours with each strain (live or KBMA) after IPTG preinduction of the T3SS. TCR-mediated B3Z activation was obtained after incubation with DCs that had been exposed to the KBMA S54-OVA strain. In contrast, we observed no activation with BMDCs infected with HK OSTAB S54-OVA and equivalent live bacteria, *i.e.*, 10 bacteria per ml. Hence, the signal obtained for the KBMA S54-OVA could not be due to this viable equivalent.

In complementary experiments, we evaluated priming of antigen-specific T cell by human moDCs that are currently used for cellular immunotherapy[40,41] treated by KBMA strain injecting the antigen. We choose the viral (flu) M1 antigen to address this question rather than a tumor antigen because it's hard to produce tumor-specific CD8 T cells from healthy donors. DCs infected with OSTAB S54-M1 or KBMA S54-M1 were used to activate flu $M1_{58-66}$ HLA-A*0201-specific CD8$^+$ T cells. Activation was assessed by measuring interferon γ (IFN-γ) production via intracellular staining within tetramer$^+$ CD8$^+$ T cells (Figure 5d). IFN-γ secretion was observed in the presence of flu-peptide-loaded T2 cells or moDCs, and in the presence of moDCs that processed the bacteria vaccine containing the flu $M1_{58-66}$ epitope (OSTAB and KBMA). As expected, IFN-γ secretion was not observed in control empty vectors (pEi). The results indicate that the flu peptide was effectively processed and presented by the moDCs infected by OSTAB and KBMA S54-M1 strains. Figure 5c is a representative row data of the intracellular IFN-γ labeling within tetramer-positive CD8 T cells whereas Figure 5d represents the pool of several experiments. Figure 5c clearly shows that the IFN-γ levels obtained with OSTAB M1—and KBMA M1—pulsed moDCs (11.1 and 8.5% respectively) are higher compared with the level obtained in control conditions (mDC loaded with control peptide, 1.7%). Figure 5d is a pool of six experiments with differential background levels. Therefore, the final mean abrogates the intraexperiment difference between the conditions. To be more consistent on this important point, we performed additional experiments by assessing the IFN-γ release in the supernatants of the cocultures (Figure 5e). This figure clearly shows a difference between the control condition (–) and OASTB M1 and KBMA M1 conditions.

In brief, KBMA *P. aeruginosa* is able to activate and mature DCs and can load them with antigens that will be processed in an major histocompatibility complex class I restricted presentation to CD8$^+$ T cells.

Vaccination with KBMA *P. aeruginosa* induces specific cellular immunity and protects mice from tumor development

To assess the capacity of the KBMA vector to raise specific CD8$^+$ T lymphocytes *in vivo*, C57BL/6J mice were injected s.c. with 5×10^6 or 5×10^7 bacteria or with multisite 2X 5×10^7 or 4X 5×10^7 bacteria on day 1 and 8. Spleens were harvested on day 14. Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assays were performed from the splenocytes stimulated with the OVA peptide

© The American Society of Gene & Cell Therapy

epitope SIINFEKL. The spleens of mice that were immunized with an OVA-secreting strain had a higher frequency of IFN-γ secreting cells than the control PBS-immunized mice (Figure 6a). The number of spot-forming cells per 4×10^5 splenocytes was significantly higher in the KBMA strain than in HK S54-OVA *P. aeruginosa*. Therefore, the KBMA strain induced a SIINFEKL peptide-specific T cell response *in vivo* as assessed in vaccinated mice. KBMA vaccination in a 4X multisite injection procedure with 2×10^8 bacteria reach the same rate of peptide-specific T $CD8^+$ cells as the OSTAB strain vaccination (5×10^6 bacteria).

We then evaluated the potential of a KBMA *P. aeruginosa* microsyringe for cancer immunotherapy. This evaluation was performed using a mouse model of syngenic B16 melanoma cells that express OVA antigen (B16-OVA cell line). The injection of B16-OVA cells into C57BL/6J mice resulted in rapid tumor development. The capacity to stimulate immunity against B16-OVA cells with a KBMA *P. aeruginosa* vaccine was first evaluated in a prophylactic vaccination scheme. A conventional prime (day 14) and boost (day 7) immunization dosing regimen and a tumor challenge at day 0 was conducted. We observed significantly better survival in mice vaccinated with two injections of KBMA S54-OVA (2X 5×10^7 bacteria) as compared with HK S54-OVA or PBS ($P = 0.0006$) (Figure 6b). In contrast, there was no significant difference between OST S54-OVA and KBMA S54-OVA (2X 5×10^7 bacteria).

To confirm the curative efficacy of the vaccine, we further investigated the survival of mice vaccinated according to our previously established therapeutic vaccination schema.[13] B16-OVA cells were implanted at day 0, and mice were then vaccinated six times with KBMA *P. aeruginosa* or live strains (1 day after and every 4 days). We observed that, in contrast to the non-immunized group (OST-EI), all of the OVA-expressing strains exhibited efficient tumor protection. The best tumor rejection efficacy occurred with 4X injections of KBMA and OSTAB S54-OVA (Figure 6c) ($P = 0.0012$).

Hence, KBMA is an efficient strain to stimulate specific immune response *in vivo* and to cure tumor.

DISCUSSION

Here, we report for the first time on an attenuated, KBMA *P. aeruginosa* T3SS-based vaccine. We used *P. aeruginosa* for two reasons: (i) *P. aeruginosa* is a pathogen that serves as an adjuvant, and we know that the host's perceived level of danger directly influences the type and intensity of the immune response;[22] and (ii) *P. aeruginosa*'s T3SS is a microsyringe, which is useful for cellular protein delivery and it helps to stimulate effector and memory T lymphocytes. In this study, the motivation for inhibiting *P. aeruginosa*'s replication was based on two major observations: (i) although its toxicity was attenuated with multiple virulent gene deletions,[24] *P. aeruginosa* was not considered safe enough to be administered to immune-compromised patients with cancer; and (ii) bacterial strain vaccines should not disseminate in the environment and potentially infect other individuals.

According to the KBMA attenuation strategy, we rendered attenuated *P. aeruginosa* strains sensitive to PCT. We obtained an optimized KBMA *P. aeruginosa* strain with a combination of 10 µmol/l of amotosalen and UVA exposure. Furthermore, we show for the first time that *P. aeruginosa*'s T3SS is still able to inject/deliver heterologous proteins into human cells after PCT *in vitro*.

Moreover, our results demonstrated that KBMA *P. aeruginosa* is less cytotoxic to murine and human DCs during early infection (3–4 hours) and that DCs viability is higher 24 hours after KBMA infection than with live strain. Because KBMA *P. aeruginosa* has attenuated cytotoxicity, we evaluated the "host danger response" by analyzing global cytokine production *in vivo* following vaccination. We found that KBMA-vaccinated mice had higher levels of proinflammatory cytokines IL-1, IL-6 and Kc (IL-8 in humans) *in vivo* than the control PBS-vaccinated mice, but their cytokine levels were significantly lower than those in mice injected with live bacteria ($P < 0.05$). Therefore, KBMA *P. aeruginosa* induced proinflammatory cytokine production in the vaccinated host. This response is necessary for successful treatment without systemic inflammation, which is deleterious for the patient (for instance systemic inflammatory response syndrome or compensatory anti-inflammatory response syndrome severe infection). Contrary to the *in vivo* results, the coincubation of KBMA with human moDCs *in vitro* led to higher cytokine levels than those in the live strain. This result illustrates the potent local adjuvant effect of KBMA *P. aeruginosa* and the benefits of lower cytotoxicity in terms of the activation/maturation of antigen-presenting cells. On the basis of our current knowledge on DC activation by microbial products, it is not surprising that KBMA induces DC maturation *in vitro*. However, the DC maturation state is an important parameter for determining the clinical effectiveness of DC-based immunotherapy.

Because the systemic response to the vaccine was decreased in mice, we decided to examine the dissemination of the KBMA *P. aeruginosa* vaccine after s.c. injection in the right flank using nanoSPECT/CT nuclear imaging. Slow bacterial dissemination was observed. We recovered bacteria in secondary lymphoid organs, such as the spleen and lymph nodes, where injection to DCs could be important for the response.

When compared with non-treated *P. aeruginosa*, injections of KBMA S54-OVA stimulated antigen-specific $CD8^+$ T cells and protected mice from tumor challenge for 40 days. The benefit of using KBMA *P. aeruginosa* is that a controlled amount of bacteria can be injected. Indeed, with less live bacteria, there is a non-controlled proliferation of the bacterial vector within the host that depends on complex, individual host/microbe interactions. The results in mice harboring OVA-expressing tumors demonstrated tumor regression in 33% of the multisite-vaccinated mice, representing a promising approach to vaccination with live-attenuated bacterial strains.

In conclusion, our data indicate that the T3SS in KBMA *P. aeruginosa* is an effective *in vivo* antigen delivery system. PCT of *P. aeruginosa* allows greater amounts of antigen to be delivered to DCs than when using a live strain without an increased systemic response. No live bacteria are released into the environment, and the patient has no risk of developing an infection. The future of live bacteria-based vaccines is linked to the success of the first product line developed by three biotech companies, AduroBiotech, Advaxis, and APCure.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, cell lines, and mice. The bacterial strains, plasmids, cell lines, mice, and primers used in this work are listed in

© The American Society of Gene & Cell Therapy

Supplementary Tables S1 and S2. The OSTAB mutants were generated from the CHA-OST[21] *P. aeruginosa* strain by Cre/lox-based mutagenesis.[34]

Human peripheral blood mononuclear cells were obtained from HLA-A*0201 + healthy donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France). moDCs were differentiated from blood monocytes using 500 U/ml of GM-CSF and 10 ng/ml of IL-4 (TEBU Peprotech, Le Perrayen-Yvelines, France) for 6 days. This study was conducted under a procedure approved by the French Blood Agency's Institutional Review Board. All donors signed informed consent forms.

BMDCs from C57BL/6J mice were prepared by C. Villiers at IAB (Grenoble, France) as previously described and were given on day 10.[21]

Amotosalen/UVA inactivation of bacteria and viability assay. For PCT, the Δ*uvrAB* strain was cultivated in LB medium at 37 °C and 250 rpm until an OD_{600} of 0.5 was reached. Various concentrations of amotosalen (a gift from Grenoble EFS) were added, and cultures were grown for 1 hour. One milliliter of culture (OD_{600} of 1) was then transferred in each well of a six-well culture plate for UVA irradiation at a dose of 7.2 J/cm² in a Stratalinker 1800 device (Stratagen, La Jolla, CA). Viability of the photochemically inactivated cultures was assessed by serial dilution and plating on PIA for colony-forming units. Points represent mean values of triplicate plates counted at the most appropriate dilution (Figure 1b). The Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit (Invitrogen) was used with manufacturer's instructions to assay the membrane integrity of the photochemically treated bacteria. With an appropriate mixture of the SYTO 9 and the propidium iodide stains, bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green, whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red.

T3SS analysis by secretion assay and Bla injection. OSTAB was transformed with the pEiS54-OVA plasmid. Resulting strains were grown overnight in LB containing 300 mg/l of carbenicillin. The next day, strains were grown in LB medium during PCT. After a washing step, the cells were resuspended in LB with or without 0.5 mmol/l of IPTG, 5 mmol/l of EGTA, and 20 mmol/l of MgCl2. The resuspension was cultivated for 3 hours at 37 °C. The EGTA-induced calcium depletion triggers the activation of *P. aeruginosa*'s T3SS and the secretion of T3SS effectors in the culture medium.[21] Supernatants were precipitated with 15% perchloric acid as described by Derouazi *et al.*[42] and were analyzed by SDS-PAGE (Mini-PROTEAN Tris Glycine 12% precast gel (Bio-Rad, Milan, Italy)). Immunoblotting was performed with polyclonal rabbit anti-chicken ovalbumin antibody (AbDserotec, Oxford, UK) at 1/5,000 in tris-buffered saline with 0.5 mg/ml bovine serum albumin to test for the presence of the secreted fusion protein S54-OVA. A control strain (not exposed to UVA) was conserved at 4 °C and OD600 = 1 during the PCT of the other strains. When necessary, we quantify the relative amount of OVA by densitometry analysis with ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD; http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012). We also tested for the presence of the OVA antigen, as previously described by Derouazi *et al.*,[42] to verify its secretion in all vaccination protocols (ELISPOT or Tumor challenge vaccination). For the Bla injection assay,[37] HL60 cells were washed once in a complete RPMI medium without antibiotics and were seeded in 48-well tissue culture plates at 2.105 cells/well in a complete RPMI medium without antibiotics. After 3 hours of infection at 37 °C and 5% CO_2, the *P. aeruginosa* strain expressed the S54-Bla fusion protein. Cells were then incubated in a freshly prepared 6xCCF2/AM solution (1 µmol/l final concentration; Invitrogen) for 30 minutes in the dark at room temperature. The percentage of cells that received S54-Bla reporter fusions was quantified by flow cytometry (FACS Moflo; Dako Cytomation, Brea, CA). The results are expressed as the percentage of cells that exhibited blue fluorescence. Uninfected cells incubated with CCF2-AM were used as a negative control.

Cytotoxicity assay. Cytotoxicity assays on murine and human DCs were assessed *in vitro*. Prior to infection, C57BL/6J BMDCs were seeded in 96-well plates at 5×10^4 cells/well for 4 hours at 37 °C with 5% CO_2. Both PCT and non-PCT bacteria were washed two times in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 1X non-essential amino acids and 1% fetal calf serum. BMDCs were infected at an MOI of 10:1, and the infection was performed for 3 hours in 200 µl of Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented in a candle jar at 37 °C. Cytotoxicity was assessed by the release of lactate dehydrogenase into the supernatants of the infected cells using a cytotoxicity detection kit (LDH; Roche, Mannheim, Germany).[43] The percentage of cytotoxicity in each experiment was calculated with the following equation: (experimental value − control with only cells)/(control with 1% Triton X-100 − control with only cells) × 100.

Dissemination in mouse. For a count of colony-forming units, three mice were injected s.c. with 5.10^7 bacteria. The animals were sacrificed 24 hours after injection, and their various organs were immediately collected and placed into 100 µl of medium. The organs were then mechanically homogenized under sterile conditions. A serial tenfold dilution was performed, and the solutions were plated on PIA Gm.

Labeling with Technetium-99m. The bacterial suspension was centrifuged (13,000*g*, room temperature for 3 minutes). The supernatant was discarded, and the pellet was mixed with 0.2 ml of 480 MBq ^{99m}Tc and 10 µl of a $SnCl_2$ solution (1 mg/ml). After stirring and 20 minutes of incubation at room temperature, the labeled bacteria were washed twice in 0.9% NaCl by centrifugation. To prevent reduced Tc reoxidization, the pellet was resuspended each time in 0.9% NaCl solution containing 0.25 g/l of ascorbic acid as a reducing agent. Radiolabeled bacteria were resuspended in 0.2 ml NaCl 0.9% NaCl, and 10 µl was used for enumeration of viable organisms. The viability of the radioactive inoculum was similar to that of mock-labeled bacteria that had been processed under the same conditions. The *in vivo* experiments were performed by s.c. inoculation of 100 µl of bacteria (5×10^7) in PBS into the rear left flanks of C57BL/6J mice. Dual modality SPECT/CT acquisitions were performed under anesthesia (1.5% isoflurane) using a dedicated preclinical camera (nanoSPECT/CT; Bioscan, Washington, DC). The animals were placed in a temperature-controlled bed, and whole body acquisitions were performed using a four-head system equipped with high-sensitivity and high-resolution multipinhole collimators (9 × 1.4 mm pinholes per head) using the following parameters. CT acquisitions were performed at 45 keVp, with 240 projections and 1 second per projection. SPECT acquisitions were performed using a 140 ± 20% KeV window, with 24 projections and a 10- or a 30-minute scan. CT and SPECT acquisitions were reconstructed fused and analyzed using dedicated software (InVivoScope, Bioscan).

moDC analysis. Human moDCs were incubated for 3 hours in RPMI 1,640–10% fetal bovine serum with *P. aeruginosa* strains at MOIs of 5:1 or 100:1. The DCs were then incubated with 250 µg/ml of gentamicin (Sigma, St Louis, MO) to kill live bacteria for an additional 24 hours in RPMI 1,640–10% fetal bovine serum. The moDCs were then washed three times with PBS. For the positive controls, moDCs were matured with 1 µg/ml of soluble recombinant human CD40L and 1 µg/ml of enhancer following the manufacturer's instructions (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) or 1 µg/ml of lipopolysaccharide (Sigma).

Antihuman mouse monoclonal fluorescent-conjugated antibodies were used to control moDC differentiation and maturation (i.e., anti-CD14, CD40, CD80, and CD83 (Beckman Coulter, Brea, CA) and CD209, CD11c, and isotype controls—BD Biosciences, San Jose, CA). Viability was assessed by flow cytometry via double-negative staining with FITC-conjugated Annexin V and 7-amino-actinomycin D (7AAD) (Beckman Coulter). Cytokine levels were assayed by Cytometric Bead Array (BD Biosciences) following the manufacturer's instructions.

For* in vitro *functional assays, antiflu M1 cytotoxic T lymphocytes were generated as previously described.[44] Briefly, GEN DCs that had been loaded with 1 µmol/l flu $M1_{58-66}$ (GILGFVFTL) peptide (NeoMPS) and irradiated (30 Gy) were cocultured with peripheral blood mononuclear cells from an HLA-A*0201$^+$ donor at a 1:10 ratio in complete medium.

© The American Society of Gene & Cell Therapy

After 1 week, cells were recovered and enriched in $CD8^+$ T cells by magnetic beads following the manufacturer's recommendation (StemCell, Grenoble, France). Specificity was controlled by iTag HLAA*0201 tetramers (Beckman Coutler, Fullerton, CA).

IFN-γ secretion by tetramer$^+$ CD8$^+$ T cells was analyzed as follows. T cells were first labeled with iTAg HLA-A*0201 tetramer-PE for 30 minutes at room temperature, then washed and restimulated with peptide-pulsed T2 cells (10:1 ratio) or mDC preincubated with KBMA for 5 hours 30 minutes. Brefeldin A (1 µl/ml, BD Biosciences) was added for the last 3 hours. Cells were then surface-labeled with anti-CD3-PC7 and anti-CD8-APC antibodies and were subjected to IFN-γ intracellular staining (BD Biosciences). IFN-γ staining was analyzed on the tetramer$^+$ $CD8^+$ T cells.

B3Z T cell hybridoma activation. C57BL/6J BMDCs (1×10^5 cells) were incubated with *P. aeruginosa* at MOI 5:1 for 3 hours at 37 °C and 5% CO_2. Then, gentamicin was added at 250 µg/ml to eliminate bacteria. Supernatants were discarded after 30 minutes. B3Z T cells and lacZ-inducible $CD8^+$ T-cell hybridomas specific to the $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) epitope presented on the murine H-2Kb class I molecule were then added at a DC/T cell ratio of 1:3 for 16 hours in RPMI with 10% fetal bovine serum, 50 µmol/l of β-mercaptoethanol, 500 µg/ml of geneticin, and 250 µg/ml of gentamicin. After centrifugation, β-galactosidase activity was determined as previously described.[45]

Multiplex bead-based immunoassay. Retro-orbital blood sampling (200 µl) from PBS-, KBMA-, and OSTAB S54-OVA-infected mice ($n = 3$) were collected in citrated tubes at 24 hours p.i. and were immediately centrifuged at 13,000*g* for 10 minutes at 4 °C. Plasma samples were stored at −80 °C. Samples were frozen and thawed only once. A mouse cytokine 23-Bio-Plex assay kit was used to perform measurements (Bio-Rad). IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Kc, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, and TNF-α were measured using Luminex technology according to the manufacturer's instructions (BioRad Laboratories, Hercules, CA). The plasma samples were diluted 1:4 and were tested in duplicate. Data collection and analysis were performed on a Bio-Plex 200 instrument equipped with Bio-Plex Manager software (version 4.1) (BioRad Laboratories) using a five-parameter non-linear regression formula to compute sample concentrations from the standard curves. The cytokine detection limit ranged between 0.2 and 45,000 pg/ml. Concentrations outside the detection limit were assigned the lowest or highest value from the corresponding standard curve.

Animal experiments. Female C57BL/6J mice were purchased at an age of 5–6 weeks from the Elevage Janvier (Le Genestet St. Isle, France) and were kept under specific pathogen-free conditions in the PHTA animal facility at the University Joseph Fourier (Grenoble, France). All animal experiments were approved by the Animal Experiment Committee of the Region and were performed in accordance with institutional and national guidelines. Mice were anesthetized with sevoflurane prior to s.c. injection of bacteria or tumor cells. If mice had tumors larger than 10 mm in the greatest dimension or if skin ulceration occurred, they were euthanized.

IFN-γ ELISpot. Mice were immunized with bacteria in 100 µl PBS twice in a 1-week interval (day 14 and day 7). On day 0, splenocytes were prepared, harvested, and resuspended in RPMI with 10% fetal bovine serum at 4×10^6 cells/ml. ELISpot analysis for detecting OVA-specific $CD8^+$ T cells was performed according to the manufacturer's protocol (Diaclone, Besançon, France). Briefly, cells were stimulated with 5 µg/ml of OVA (SIINFEKL) peptide in an IFN-γ capture ELISpot plate (MultiScreen HTS filter plates; Millipore, Danvers, MA) for 18–20 hours. After that, the number of spot-forming cells was counted using an automated ELISpot reader (Bioreader 4,000 Pro; Biosys, Karben, Germany).

Protection against tumor cell challenge. In the prophylactic assay, six mice per group were immunized according to the schedule mentioned in section IFN-γ ELISpot of the methods to analyze the capacity of the KBMA strain to stimulate immune response. Mice were s.c. injected with different strains in the right flank 14 and 7 days before the s.c. injection of 2.10^5 B16-OVA cells in the left flank. For the curative assay, six mice were s.c. injected with 2.10^5 B16-OVA cells in 100 µl of PBS on day 1, then vaccinated with different strains on the next day and every 4 days, up to six times.

Statistical analysis. Results are expressed as the means ± SD unless stated otherwise. Statistical comparisons between two groups were evaluated by the Student's *t*-test and corrected by ANOVA for multiple comparisons. A P value of <0.05 was considered to indicate statistical significance. Unless otherwise indicated, all experiments were conducted at least twice. Log-rank tests (Mantel–Cox) were used to compare the Kaplan–Meier tumor survival curves and were performed using GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA; www.graphpad.com). For multiplex cytokines analysis, Mann–Whitney test statistical analysis was performed.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. KBMA P. aeruginosa deliver OVA to BMDCs, where the antigen is loaded into the major histocompatibility complex class I pathway.

Table S1. Bacterial strains, plasmids, cell lines, and mice used in this study.

Table S2. Primers used in this study.

Table S3. The *in vivo* toxicity of KBMA *P. aeruginosa*. Mortality of C57BL/6J mice after s.c. injection of 5×10^6, 5×10^7, 5×10^8, or 5×10^9 bacteria.

Table S4. Analysis of systemic response by xMAP technology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank O Epaulard and AL Fiser for their assistance in developing this manuscript, and G Baptist and J Geiselmann for their assistance with the live/dead *Bac*Light experiment. This work was supported by GRAVIT grant number 081202 and Ligue contre le cancer (comité ardèche). The authors thank the "Etablissement Français du sang" for the gift of amotosalen S-59, the access to ELISPOT reader. Finally, authors thank Ina Attree at CEA (Grenoble) for the access to the moFlo FACS. ALG, BP, and BT declare competing financial interest. They are the cofounders of APCure, a start-up that produces immunotherapy treatments for patients with cancer. The work was done in Grenoble, France.

REFERENCES

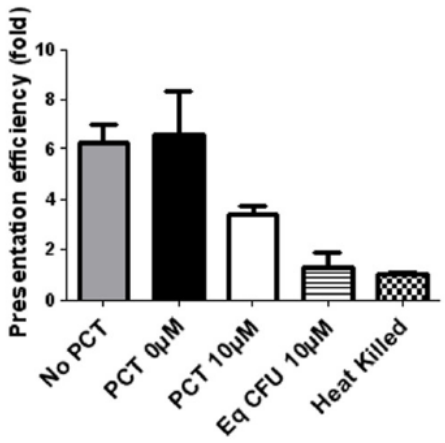
1. Coley, WB (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**: 488–511.
2. Bernardes, N, Seruca, R, Chakrabarty, AM and Fialho, AM (2010). Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects. *Bioeng Bugs* **1**: 178–190.
3. Forbes, NS (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **10**: 785–794.
4. Carleton, HA (2010). Pathogenic bacteria as vaccine vectors: teaching old bugs new tricks. *Yale J Biol Med* **83**: 217–222.
5. Guirnalda, P, Wood, L and Paterson, Y (2012). Listeria monocytogenes and its products as agents for cancer immunotherapy. *Adv Immunol* **113**: 81–118.
6. Hegazy, WA, Xu, X, Metelitsa, L and Hensel, M (2012). Evaluation of Salmonella enterica type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. *Infect Immun* **80**: 1193–1202.
7. Sevil Domènech, VE, Panthel, K, Winter, SE and Rüssmann, H (2008). Heterologous prime-boost immunizations with different Salmonella serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction. *Vaccine* **26**: 1879–1886.
8. Le Gouellec, A, Chauchet, X, Polack, B, Buffat, L and Toussaint, B (2012). Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Hum Vaccin Immunother* **8**: 1454–1458.
9. Shahabi, V, Maciag, PC, Rivera, S and Wallecha, A (2010). Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs* **1**: 235–243.
10. Singh, R and Wallecha, A (2011). Cancer immunotherapy using recombinant Listeria monocytogenes: transition from bench to clinic. *Hum Vaccin* **7**: 497–505.
11. Hauser, AR (2009). The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**: 654–665.
12. Derouazi, M, Toussaint, B, Quénée, L, Epaulard, O, Guillaume, M, Marlu, R *et al.* (2008). High-yield production of secreted active proteins by the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3601–3604.

© The American Society of Gene & Cell Therapy

13. Wang, Y, Gouëllec, AL, Chaker, H, Asrih, H, Polack, B and Toussaint, B (2012). Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J Immunother* **35**: 223–234.
14. Panthel, K, Meinel, KM, Sevil Domènech, VE, Trülzsch, K and Rüssmann, H (2008). Salmonella type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int J Med Microbiol* **298**: 99–103.
15. Xiong, G, Husseiny, MI, Song, L, Erdreich-Epstein, A, Shackleford, GM, Seeger, RC *et al.* (2010). Novel cancer vaccine based on genes of Salmonella pathogenicity island 2. *Int J Cancer* **126**: 2622–2634.
16. Evans, DT, Chen, LM, Gillis, J, Lin, KC, Harty, B, Mazzara, GP *et al.* (2003). Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the Salmonella type III secretion antigen delivery system. *J Virol* **77**: 2400–2409.
17. Rüssmann, H, Shams, H, Poblete, F, Fu, Y, Galán, JE and Donis, RO (1998). Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**: 565–568.
18. Shams, H, Poblete, F, Rüssmann, H, Galán, JE and Donis, RO (2001). Induction of specific CD8+ memory T cells and long lasting protection following immunization with Salmonella typhimurium expressing a lymphocytic choriomeningitis MHC class I-restricted epitope. *Vaccine* **20**: 577–585.
19. Rüssmann, H, Igwe, EI, Sauer, J, Hardt, WD, Bubert, A and Geginat, G (2001). Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins. *J Immunol* **167**: 357–365.
20. Chen, G, Dai, Y, Chen, J, Wang, X, Tang, B, Zhu, Y *et al.* (2011). Oral delivery of the Sj23LHD-GST antigen by Salmonella typhimurium type III secretion system protects against Schistosoma japonicum infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1313.
21. Epaulard, O, Toussaint, B, Quenee, L, Derouazi, M, Bosco, N, Villiers, C *et al.* (2006). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. *Mol Ther* **14**: 656–661.
22. Blander, JM and Sander, LE (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* **12**: 215–225.
23. Stocker, BA (1988). Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine. *Vaccine* **6**: 141–145.
24. Epaulard, O, Derouazi, M, Margerit, C, Marlu, R, Filopon, D, Polack, B *et al.* (2008). Optimization of a type III secretion system-based Pseudomonas aeruginosa live vector for antigen delivery. *Clin Vaccine Immunol* **15**: 308–313.
25. Fensterle, J, Bergmann, B, Yone, CL, Hotz, C, Meyer, SR, Spreng, S *et al.* (2008). Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer Gene Ther* **15**: 85–93.
26. Kotton, CN, Lankowski, AJ, Scott, N, Sisul, D, Chen, LM, Raschke, K *et al.* (2006). Safety and immunogenicity of attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the Salmonella Type III secretion system. *Vaccine* **24**: 6216–6224.
27. Priebe, GP, Brinig, MM, Hatano, K, Grout, M, Coleman, FT, Pier, GB *et al.* (2002). Construction and characterization of a live, attenuated aroA deletion mutant of Pseudomonas aeruginosa as a candidate intranasal vaccine. *Infect Immun* **70**: 1507–1517.
28. Döring, G and Pier, GB (2008). Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. *Vaccine* **26**: 1011–1024.
29. Detmer, A and Glenting, J (2006). Live bacterial vaccines–a review and identification of potential hazards. *Microb Cell Fact* **5**: 23.
30. Brockstedt, DG, Bahjat, KS, Giedlin, MA, Liu, W, Leong, M, Luckett, W *et al.* (2005). Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat Med* **11**: 853–860.
31. Sancar, A and Sancar, GB (1988). DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* **57**: 29–67.
32. Wollowitz, S (2001). Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin Hematol* **38**(4 Suppl 11): 4–11.
33. Dubensky, TW Jr, Skoble, J, Lauer, P and Brockstedt, DG (2012). Killed but metabolically active vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **23**: 917–923.
34. Quénée, L, Lamotte, D and Polack, B (2005). Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in pseudomonas aeruginosa. *BioTechniques* **38**: 63–67.
35. Lankowski, AJ and Hohmann, EL (2007). Killed but metabolically active Salmonella typhimurium: application of a new technology to an old vector. *J Infect Dis* **195**: 1203–1211.
36. Hueck, CJ (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
37. Verove, J, Bernarde, C, Bohn, YS, Boulay, F, Rabiet, MJ, Attree, I *et al.* (2012). Injection of Pseudomonas aeruginosa Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PLoS ONE* **7**: e30488.
38. Worgall, S, Martushova, K, Busch, A, Lande, L and Crystal, RG (2002). Apoptosis induced by Pseudomonas aeruginosa in antigen presenting cells is diminished by genetic modification with CD40 ligand. *Pediatr Res* **52**: 636–644.
39. Karttunen, J, Sanderson, S and Shastri, N (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6020–6024.
40. Banchereau, J and Palucka, AK (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**: 296–306.
41. Palucka, K and Banchereau, J (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**: 265–277.
42. Derouazi, M, Wang, Y, Marlu, R, Epaulard, O, Mayol, JF, Pasqual, N *et al.* (2010). Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2. *Bioeng Bugs* **1**: 51–60.
43. Dacheux, D, Attree, I, Schneider, C and Toussaint, B (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 6164–6167.
44. Aspord, C, Charles, J, Leccia, MT, Laurin, D, Richard, MJ, Chaperot, L *et al.* (2010). A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* **5**: e10458.
45. Radford, KJ, Higgins, DE, Pasquini, S, Cheadle, EJ, Carta, L, Jackson, AM *et al.* (2002). A recombinant E. coli vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation: application to cancer immunotherapy. *Gene Ther* **9**: 1455–1463.

Supplementarydata

Supplementary Figure 1.KBMA *P. aeruginosa* deliver OVA to BMDCs, where the antigen is loaded into the MHC class I pathway.BMDCs were incubated for 3 h with *P. aeruginosa* expressing S54-OVA without PCT or with PCT plus 0 or 10 µM of amotosalen. Ten bacteria/ml of HK S54-OVA bacteria was used as a control. DCs were then incubated with gentamicin (250µg/ml) to eliminate the bacteria. Presentation of the SIINFEKL epitope on MHC class I molecules was examined by co-incubation with B3Z T cell hybridomas and measurement of β-galactosidase production after 16 h. The absorbance of HK S54-OVA was set to 1. The vertical axis shows the relative value per pEiS54-OVA bacterium (5 x 10^5 bacteria). The results are presented as the means + s.d. of triplicate wells. This experiment was repeated twice with similar results.



Supplementary Table 1.Bacterial strains, plasmids, cell lines and mice used in this study.

Name	Relevant characteristics/sequence	Source or reference
Bacterial Strains		
CHA	Wild type, mucoid CF isolate from CHU Grenoble	44
OST	Deleted for Exotoxins S and T	21, 37
OSTABGmlox	OST *ΔuvrA::lox ΔuvrB::Gmlox,* Gm^Rsusceptible to photochemical treatment	This work
OSTAB	OST *ΔuvrA::lox ΔuvrB::lox,* susceptible to photochemical treatment	This work
OSTAB*ΔpopBD*	OSTAB *ΔpopBD::Gmlox*	This work
OST S54-OVA	OST transformed with pEiS54 $OVA_{248-376}$, Cb^R	10
OSTAB S54-OVA	OSTAB transformed with pEiS54 $OVA_{248-376}$, Cb^R	This work
OSTAB S54-M1	OSTAB transformed with pEiS54 M_1-K_{252}, Cb^R	This work
OSTAB S54-Ei	OSTAB transformed with empty pEiS54	This work
Plasmids		
pEiS54		9
pEiS54-OVA	Chicken Ovalbumin (D_{248}-A_{376})fused to $ExoS_{1-54}$	10
pEiS54-M1	M1 Flu Puerto Rico Full length (M_1-K_{252}) fused to $ExoS_{1-54}$	This work
pEiS0-OVA	Chicken Ovalbumin (D_{248}-A_{376})without secretion tag	16
pEX100TUvrA::Gm	*uvrA* up and down fragment amplified with primers F and R	This work
pEX100TUvrB::Gm	*uvrB* up and down fragment amplified with primers F and R	This work

Supplementary Table 2. Primers used in this study.

Primer name	Sequence 5' to 3'	Restriction site
Deletion of *uvrA*		
UvrA Up-F	CTGAATTCGGCCCCCCTCGTGCACCAGT	*Eco*RI
UvrA Up-R	GTAAGCTTGCGCCCCACGAATCAGGATC	*Hind*III
UvrA Down-F	GTAAGCTTGCCGAGATGCCCCAGTCGCA	*Hind*III
UvrA Down-R	CTGAATTCGGCGGACCACTGG	*Eco*RI
Deletion of *uvrB*		
UvrB Up-F	GAATTCGCGCAGCGTCGGATCT	*Eco*RI
UvrB Up-R	AAGCTTCATCGAGCAGGTGGTGCG	*Hind*III
UvrB Down-F	AAGCTTGTTGTTGTTGCGCAGGTA	*Hind*III
UvrB Down-R	GGATCCTTGGCGTCACAGCTCC	*Bam*HI
External primer		
UvrA-F	CCTCATGGAAGAAACCGCTG	
UvrA-R	GATCACATAAGCACCAAGCG	
UvrB-F	AGGGTAGTCACCAGCACCC	
UvrB-R	GATGTGATCGACATCTTCCC	
Influenza M1 (M_1-K_{252}) cloning		
M1 *Age*I-F	CCACCGGTAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAA	*Age*I
M1 *SphI*-R	CTTGCATGCTCACTTGAACCGTTGCATCT	*Sph*I

Supplementary Table 3. The *in vivo* toxicity of KBMA *P. aeruginosa*. Mortality of C57BL/6J mice after s.c. injection of 5 x 10^6, 5 x 10^7, 5 x 10^8 or 5 x 10^9 bacteria.

Strain	Dose	Mortality
OST	5 x 10^6	0/3
	5 x 10^7	3/3
OSTAB	5 x 10^6	0/3
	5 x 10^7	3/3
KBMA OSTAB	5 x 10^7	0/3
	5 x 10^8	1/3
	5 x 10^9	3/3

Supplementary Table 4. Analysis of systemic response by xMAP technology.

Cytokines (pg/ml)	Mean ± Std error			Mann-Whitney test		
	PBS group	OST group	KBMA group	OST vs PBS	KBMA vs PBS	OST vs KBMA
IL-1α	42 ± 5	1842 ± 333	91 ±10	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
IL-1β	375 ± 34	10691 ± 2731	383 ± 46	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-2	28 ± 3	100 ± 20	21 ± 2	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-3	12 ± 1.3	43 ± 3.5	9 ± 1	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-5	53 ± 3	64 ± 2	53 ± 4	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-6	41 ± 9	>15000	70 ± 6	ND	NS	ND
Kc	77 ± 4	>15000	258 ± 8	ND	P = 0.0495	ND
IL-9	300 ± 51	1621 ± 191	274 ± 14	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-10	219 ± 15	6259 ± 592	270 ± 19	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
IL-12p40	175 ± 11	5182 ± 884	182 ± 14	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-12p70	197 ± 13	607 ± 22	158 ± 16	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
IL-13	1138 ± 80	2052 ± 149	1457 ± 88	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
IL-17	105 ± 6	1621 ± 528	63 ± 4	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
Eotaxin	970 ± 109	8991 ± 936	1111 ± 102	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
GCS-F	156 ± 12	>40000	8869 ± 1522	ND	P = 0.0495	ND
GM-CSF	125 ± 11	339 ± 14	152 ± 7	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
INF-γ	315 ± 24	1459 ± 577	296 ± 25	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
MCP-1	487 ± 27	>12000	537 ± 31	ND	NS	ND
MIP-1α	36 ± 2	1258 ± 132	60 ± 7	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
MIP-1β	186 ± 13	566 ± 77	172 ± 16	P = 0.0495	NS	P = 0.0495
RANTES	54 ± 5	1255 ± 124	128 ± 15	P = 0.0495	P = 0.0495	P = 0.0495
TNF-α	936 ± 62	2154 ± 582	825 ± 82	P = 0.0495	NS	P = 0.0495

Data are expressed as the means ± s.d. in pg/ml with n=3. Abbreviations: IL = interleukin; NS = not significant; ND = not determined. P values for the Mann-Whitney U test are represented. Statistical significance is indicated when P< 0.05.

PARTIE II

ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNE ANTI-TUMORALE INDUITE EN TERME D'INFILTRATION TUMORALE ET DE RÉPONSE T CD8+ MÉMOIRE

PUBLICATION N° 2

Chauchet X, Le Gouëllec A, Hannani D, Djebali S, Buffat L, Polack B, Marvel J and Toussaint B. **Recombinant and attenuated *Pseudomonas aeruginosa* strains elicit tumor-infiltrating antigen-specific CD8+ T lymphocytes and long-lasting memory response.** En préparation pour soumission. 2014

OBJECTIFS ET CONTRIBUTION AUX TRAVAUX

Cette seconde partie du travail expérimental a eu pour objectif de caractériser la réponse antitumorale induite par les vecteurs bactériens *P. aeruginosa* atténué (OST) et *Killed But Metabollicaly Active* (KBMA) *in vivo* dans un modèle tumoral de mélanome murin B16-OVA sous-cutané. Cette étude a été scindée en deux parties afin d'évaluer deux caractéristiques fondamentales conditionnant l'efficacité d'une immunothérapie active spécifique. Nous avons dans un premier temps mis au point un modèle tumoral thérapeutique nous permettant d'évaluer l'infiltrat lymphocytaire tumoral suite à la vaccination, et de mettre notamment en évidence la présence de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène. Dans un second modèle nous nous sommes intéressés à la protection à long terme induite par la vaccination et au phénotype des lymphocytes T CD8+ mémoires spécifiques de l'antigène.

L'ensemble de ce travail expérimental a été réalisé au laboratoire TheREx en collaboration avec la start-up APCure et avec le Centre International de Recherche en Infectiologie (INSERM U1111, Lyon).

RECOMBINANT AND ATTENUATED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ELICIT TUMOR-INFILTRATING ANTIGEN-SPECIFIC CD8+ T LYMPHOCYTES AND LONG-LASTING MEMORY RESPONSE

Xavier Chauchet[1], Audrey Le Gouëllec[1,4], Dalil Hannani[2], Sophia Djebali[3], Laurent Buffat[2], Benoit Polack[1,5], Jacqueline Marvel[3] and Bertrand Toussaint[1,4,*]

[1]Laboratoire TIMC-TheREx (UMR 5525 CNRS-UJF), Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier Grenoble I, La Tronche, France

[2]APCure SAS, 69007 Lyon, France

[3]CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, 69365 Lyon, France

[4]Département de Biochimie Toxicologie Pharmacologie, UM Biochimie des Enzymes et des Protéines, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, BP 217-38043 Grenoble, France

[5]Département d'Hématologie Oncologie Génétique et Immunologie, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, BP 217 – 38043 Grenoble, France

**Author for correspondence : btoussaint@chu-grenoble.fr*

Abstract

Live-attenuated bacterial vectors for antigens delivery have recently aroused growing interest in the field of cancer immunotherapy. They are able to stimulate both innate and adaptive immunity and to promote intracellular antigen delivery, leading to a specific and potent cellular immune response against tumor cells. We previously developed genetically-modified and attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vectors able to deliver *in vivo* protein antigens, through type III secretion system (T3SS) of the bacteria. We proved, using aggressive B16 melanoma transfected with OVA as a surrogate tumor antigen, that we were able to protect vaccinated mice against tumor development in both prophylactic and therapeutic settings. In the present study, we further investigated the antigen-specific $CD8^+$ T cell immune response, in term of

phenotypic and functional aspects. Furthermore, we obtained data allowing to compare effectiveness of two different *P. aeruginosa* OVA-expressing vectors, which differ in their attenuation profile. We characterized two essential hallmarks of a good cancer vaccine: induction of antigen-specific $CD8^+$ tumor-infiltrated lymphocytes (TILs) and long-term memory response. We showed that a large number of activated OVA-specific $CD8^+$ T lymphocytes infiltrated the tumor with both attenuated bacterial vectors, and we demonstrated that *in vitro* restimulation of the tumor cell suspension with the immunodominant CTL epitope of OVA in H-2b mice (SIINFEKL) led to production of T $CD8^+$ intracellular cytokines, even in the context of tumor immunosuppressive environment. On another hand, long-term tumor protection was conferred by multiple immunizations with both bacterial vectors. Interestingly, highly functional pool of predominantly effector memory OVA-specific $CD8^+$ T cells mediated these long-lasting protections. Overall, our data demonstrate that the safe KBMA *P. aeruginosa* vaccine may be a promising approach for active and specific anti-tumor immunotherapy.

Keywords: Cancer immunotherapy, bacterial vectors, *Pseudomonas aeruginosa*, type 3 secretion system, tumor-infiltrating lymphocytes, T $CD8^+$ memory response.

List of abbreviations: APC, Antigen-Presenting Cells; CTL, Cytotoxic T Lymphocyte; DLN, Draining Lymph Node; FDA, Food and Drug Administration; HK, Heat-Killed; KBMA, Killed But Metabolically Active; PRRs, Pattern-Recognition Receptors; UVA, long-wave UV light;

Introduction

For about fifteen years, many cancer immunotherapy strategies have been evaluated in pre-clinical and clinical studies [1]. The first active and specific immunotherapy (ASI) was recently approved by the FDA for the treatment of advanced prostate cancer in 2010 (sipuleucel-T) [2]. Although the benefit to the patient is moderate, this clinical milestone is paving the way for the development of new Cancer Vaccines [3]. The aim of ASI is to harness the immune system for the generation or the re-mobilization of specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) response(s) against tumor antigens. Nevertheless, we know that such approach has to respond several requirements [4]. First, the stimulation of a robust pro-inflammatory innate immune response through 'Danger signals' is needed to mature APCs. The type of signal will be a condition for APCs maturation and their ability to both secrete cytokines (i.e. IL-12) and present antigens. Second, tumor antigens must be displayed by MHC I complex (through delivery into the intracellular compartment or through cross-presentation pathway) to promote a presentation to naive $CD8^+$ T cells. Third, APCs have to prime naive T cells into the lymph node to initiate antigen-specific immune response. And fourth, antigen-specific lymphocytes must be able to infiltrate the tumor bed and overcome local immunosuppression.

One of the many particular innovative way investigated in order to succeed in these four challenges is to use attenuated bacterial vectors because of their beneficial 'natural adjuvant' properties and their particular lifestyle, providing antigens delivery into the intracellular compartment of APCs, and therefore antigen presentation on the MHC class I pathway. The most advanced candidates are the facultative intracellular bacteria *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, which have already been studied in preclinical and clinical trials. Strong anti-tumor antigen-specific $CD8^+$ and $CD4^+$ responses have been reported with attenuated strains[5,6].

In contrary to the previously described bacteria, *P. aeruginosa* is an extracellular Gram-negative opportunistic pathogen. We previously demonstrated that attenuated strains of *P. aeruginosa* are efficient *in vitro* and *in vivo* protein delivery vectors into the cytosol of eukaryotic cells and are able to drive cellular immune response against antigen-bearing cells [7–12]. Several genetically engineered strains are able to deliver antigen of interest into host cells through the so called type 3 secretion system (T3SS). Strong efficacy was demonstrated for priming antigen-specific CTL cells yielding to protection of mice against aggressive melanoma [8,10,13]. In the present work, we use the OSTAB *P. aeruginosa* strain, deleted for major T3SS-exotoxins ExoS and ExoT and for two subunits (UvrA and UvrB) of the exonuclease ABC, which takes part of the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway that removes damage induced by UV light. Following photo-inactivation, with UVA radiation in presence of amotosalen (psoralen S-59), live OSTAB bacteria become Killed But Metabolically Active (KBMA) bacteria, unable to replicate but still immunologically active [10]. Then, we use the murine B16-OVA melanoma to better characterize and compare the antitumor immune response, in terms of tumor-infiltrating lymphocytes and T $CD8^+$ memory response, following immunizations with both live (OSTAB) and KBMA *P. aeruginosa*-OVA vectors.

The memory pool of $CD8^+$ T cells, identified by its re-expression of CD127 (IL-7Rα) during effector phase[14], contains 2 major distinct subsets, the so-called T effector-memory (T_{EM}) and T central-memory (T_{CM}), that differ in their phenotype, trafficking patterns, tissue residence and functional characteristics [15]. This division is based on CD62-L (homing receptor in lymphoid tissues) or CCR7 expression. Typically, T_{CM} cells express CD62-L and CCR7 and localize predominantly to lymphoid tissue, whereas T_{EM} cells are negative for CD62-L and CCR7 and prevail at peripheral sites. T_{CM} have been also described as better to proliferate following antigenic recall, while T_{EM} are highly cytolytic and proliferate slightly [16–18]. Whereas an important controversy in the community of immunologists to determine which memory

response confers the best protection against pathogens but also which subtype of memory T cells is suitable for immunotherapy, there is a need to explore the response induced by different vectors and to compare the conferred-efficacy. In this context, Stark *et al.* had described distinct long-lasting tumor protection correlated to disparate $CD8^+$ memory response following vaccination with recombinant OVA-expressing *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* vectors. Although both of the recombinant vectors induced long-term OVA $CD8^+$ T cells with comparative cytolytic functions, *Listeria* led to predominant central-memory CD8+ T cells (CD62-L^{high} $CD127^{high}$) with strong proliferation and self-renewal capabilities, better to confer long-term tumor protection. On the other hand, *Salmonella* induced effector-memory $CD8^+$ T cells (CD62-L^{low} $CD127^{high}$) unable to expand, with a lower tumor protection [19].

In our study with both live OSTAB and KBMA *P. aeruginosa*-OVA vectors, we show that we are able to confer a robust long-term tumor protection against a challenge with B16-OVA melanoma, which is associated to a predominantly highly functional effector-memory phenotype. Furthermore, in a therapeutic setting, we describe a slowdown of tumor growth a few days after vaccination associated with an important increase of antigen-specific T $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes, and a modification of the ratio between effector $CD8^+$ T cells and suppressor immune T_{REG} cells within tumors.

Material and Methods

Bacterial strains, cell line and mice. The attenuated *P. aeruginosa* OSTAB mutant susceptible to photochemical treatment (PCT) and the corresponding OSTAB S54-Ei (empty vector, without antigen) and OSTAB S54-OVA (chicken ovalbumin (D_{248}-A_{376}) fused to $ExoS_{1-54}$) transformed strains were previously described[10]. Bacteria were grown in LB medium with 300mg/l of carbenicillin at 37°C and 250rpm.

B16-OVA melanoma cells from C57BL/6J mice were cultivated in complete DMEM Glutamax (Gibco, Invitrogen, France) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml of penicillin and 100mg/ml of streptomycin and 500µg/ml Geneticin (Gibco, Invitrogen, France). The cells were passaged using 0.05% trypsin/0.02% EDTA solution (Gibco, Invitrogen, France) and were cultivated at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator.

Female C57BL/6J mice were purchased at 6 weeks old from the Elevage Janvier (Le Genestet St. Isle, France) and were kept under specific pathogen-free conditions in the PHTA animal facility at the University Joseph Fourier (Grenoble, France). All animal experiments were approved by the Animal Experiment Committee of the Region (Cometh) and were performed in accordance with institutional and national guidelines. Mice were anesthetized with isoflurane prior to subcutaneous (s.c) bacteria injection and for retro-orbital blood sampling.

Photochemical treatment for KBMA vaccine. KBMA bacteria were prepared as previously described [10]. Briefly, OSTAB S54-OVA strain was inoculated in LB at OD_{600} 0.2 with 1mM of IPTG and 300mg/l of carbenicillin. When an OD_{600} of 0.5 was reached, a concentration of 10µM of amotosalen was added. Then, cultures were grown until OD_{600} of 1. One milliliter of culture was then transferred in a well of a 6-well cell culture plate for UVA irradiation at a dose of 7.2 J/cm^2 in a Stratalinker 1800 device (Stratagen, La Jolla, CA). Viability of the photochemically inactivated cultures was assessed by plating bacteria on *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) and counting of the colony-forming units. Following a PCT with 10µM of amotosalen, 1 live organism per 1.25x10^8 bacteria is able to replicate after OSTAB strain photo-inactivation.

Immunizations. For immunizations, KBMA bacteria were prepared as described above. Live OSTAB S54-OVA and OSTAB S54-Ei strains were grown overnight in LB containing 300

mg/l of carbenicillin at 37°C and 250 rpm. The next day, after two washing steps in LB, bacteria were resuspended in LB with 1 mM of IPTG and 300mg/l of carbenicillin at an OD_{600} of 0.2 and cultured until an OD_{600} of 1.6. Then bacteria (KBMA and OSTAB strains) were harvested and washed two times in PBS. Heat-Killed (HK) S54-OVA bacteria were prepared from OSTAB S54-OVA strain by heating at 65°C for 1 hour.

Mice were s.c. injected in the left flank (1X vaccination, 100µl each) with $5x10^6$ OSTAB (S54-Ei or S54-OVA) bacteria, or in the right and left flanks and the right and left shoulders (4X vaccinations, 50µl each) with $5x10^7$ KBMA S54-OVA or HK S54-OVA bacteria/injection site.

Tumor challenge. *Therapeutic setting* : $2x10^5$ B16-OVA tumor cells were injected s.c into the right flank after shaving at day 0 and when tumors became palpable (between 5 to 8 days), we began to immunize mice. *Long-term tumor prevention study* : 6 mice per group were s.c. inoculated with different immunization conditions as previously described. 50 or 85 days after the last immunization, $2x10^5$ B16-OVA were injected into the right flank. For each experiment, tumors were measured each 2 days (length x width in square millimeter). When tumor size reached $150mm^2$, mice were euthanatized.

Tumor-infiltrated lymphocytes analysis. B16-OVA tumors were harvested when a significant difference in tumor size was observed between treated and controlled groups, cut into small pieces and resuspended in 3 ml of RPMI 1640 containing Liberase TM 25 mg/ml (Roche). A first dissociation with a gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) was performed and samples were then incubated for 30min at 37°C, before a second dissociation with the gentleMACS dissociator. After washing with PBS and passing through a 70µm strainer, cell suspension were used for subsequent immunostaining or restimulation.

175 ***Antibodies, MHC multimers and flow cytometry.*** Anti-mouse antibodies for CD45 (30-F11),
176 CD4 (GK1.5 or RM4-5), CD8a (53-6.7), CD44 (IM7), IL-7Rα (SB/199), CD62-L (MEL-14),
177 KLRG1 (2F1), IFNγ (XMG1.2), TNFα (MP6-XT22), IL-2 (JES6-5H4), CD107a (1D4B),
178 FoxP3 (FJK-16s) were obtained from eBioscience (Paris, France) or BD Biosciences (Pont de
179 Claix, France). $H2K^b$-SIINFEKL ($OVA_{257-264}$) Dextramer® was purchased at Immudex (Co-
180 penhagen, Denmark) and staining was performed as described by manufacturer's instruction.
181 The Fixable Viability Dye (FVD eF780, eBioscience) was used for tumor-infiltrated study to
182 improve analyses. Flow cytometry data have been acquired on a BD Biosciences FACSCanto
183 II and analyses carried out with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).
184
185 ***Phenotypic characterization of antigen-specific CD8+ T cells.*** Splenocytes or blood cells
186 were harvested at various time intervals, stained first with $H2K^b$-SIINFEKL multimers and
187 with antibodies against CD45 (only for blood cells), CD4, CD8, CD44, CD127, CD62-L and
188 KLRG1. For the numeration of cells in blood samples, we used Flow-Count Fluorosheres®
189 (Beckman Coulter). Cells were fixed in FACS lysing buffer (BD Biosciences) and acquired
190 by flow cytometry.
191 For the tumor infiltration study, cells were stained first with $H2K^b$-SIINFEKL multimers, then
192 with antibodies against CD45, CD4, CD8, CD44 and with the fixable viability marker. In a
193 second step, intracellular expression of FoxP3 was assessed by staining with the
194 FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience).
195
196 ***$CD8^+$ T cell function, intracellular staining.*** Intracellular cytokines production by antigen-
197 specific $CD8^+$ T cells was carried out by restimulation for 4 hours on splenocytes or tumor
198 cell suspension with SIINFEKL peptide ($OVA_{257-264}$, 10µg/ml) or without peptide, as a con-
199 trol, for each condition. Monensin (0,7µl/ml, GolgiStop, BD Biosciences) was added before

starting restimulation and also anti-CD107a antibody to look for degranulation by CTLs. Cells were then surface-labeled with anti-CD8, anti-CD4 antibodies and were subjected to intracellular cytokines staining (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Intracellular cytokines were analyzed only on $CD8^+$ T cells.

Statistical analysis. Results are expressed as the means ± s.e.m. unless stated otherwise. Statistical comparisons between two groups were evaluated by the Student's *t*-test. A *P* value <0.05 was considered to indicate statistical significance. Unless otherwise indicated, all experiments were conducted at least twice. Log-rank tests (Mantel-Cox) were used to compare the Kaplan-Meier tumor survival curves. Statistical and graphical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Both live and KBMA P. aeruginosa therapeutic vaccines induced potent immune responses controlling the growth of aggressive B16 melanoma tumors

We previously demonstrated that 30% of mice did not develop B16-OVA melanoma when immunizations by KBMA S54-OVA or live OSTAB S54-OVA *P. aeruginosa* vectors were started 1 day after tumor implantation [10]. In the present work, B16-OVA tumor cells were implanted in C57BL/6J mice and only when tumors became palpable (about 5 to 8 days after s.c implantation of $2x10^5$ cells), we immunized mice and reproduced the vaccinations every 3 to 4 days (Fig.1a). This new schedule of therapeutic setting allows us to follow the impact of multiple immunizations after appearance of a measurable tumor, and thereafter to compare tumor infiltration in different treated groups. Based on three independent experiments, therapeutic immunizations of mice both vaccinated with live OSTAB S54-OVA and KBMA S54-

OVA vectors, induced a marked slowdown in tumor growth, in comparison with the OSTAB S54-Ei (empty vector) condition (P<0.001; Fig.1b). No significant difference between KBMA S54-OVA and live OSTAB S54-OVA was established. Interestingly, tumor growth stabilization or regression in the OSTAB S54-OVA or KBMA S54-OVA group (Fig. 1c) were observed systematically at 6-7 days after the first immunization. This delay may correspond to the period of implementation of the OVA-specific immune response. In contrast, in the control group OSTAB S54-Ei and heat-killed S54-OVA (HK S54-OVA), in most of cases continuous tumor growth was observed after immunizations. However, we noticed that tumors were growing more heterogeneously when mice were immunized with HK S54-OVA bacteria.

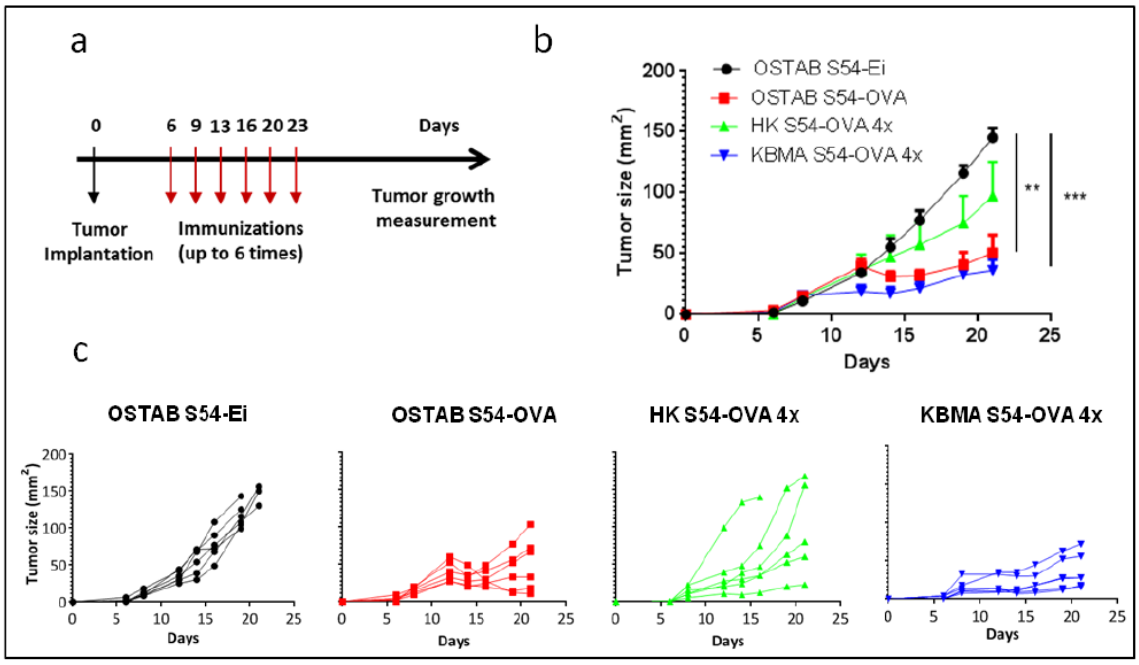


Figure 1: Multiple immunizations with OSTAB S54-OVA or KBMA S54-OVA slow tumor growth of s.c. aggressive B16-OVA melanoma. (a) Experimental setting. 2x10^5 B16-OVA cells have been injected at day 0. When tumor became palpable (at day 6 on the presented experiment), C57BL/6 mice bearing palpable tumor received s.c. vaccination every 3-4 days, up to 6 times. Tumor growth was monitored every 2 days and mice were euthanized when tumor reach 150mm^2. **(b)** Tumor growth curves (mean ± s.e.m.) of one typical experiment out of three. N=6 mice/group. **(c)** Individual tumor growth curves of the same experiment. ** P<0.01, *** P<0.001 determined by Student t test.

Live or KBMA P. aeruginosa-OVA vectors induce a strong but slightly functional tumor-infiltrating OVA-specific CD8$^+$ T cell response and modify the ratio between CD8$^+$ T cells and CD4$^+$ FoxP3$^+$ T_{REG} cells within the tumor

Many studies report that CD8$^+$ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) delay tumor progression, despite the immunosuppressive tumor environment, and are associated to a survival benefit in patients [20–22]. Indeed, one challenge in cancer vaccine development is to induce a strong CD8$^+$ infiltration of the tumor and to overcome this immunosuppressive environment by shifting the balance between effector cells and regulatory cells[23]. To assess the tumor-infiltrating lymphocytes induced by *P. aeruginosa*-OVA vectors, we performed the experiment described in Figure 1a. When significant difference in tumor growth between groups was observed during the period of immunization (at day 21 in the presented experiment), we harvested the tumor, the tumor-draining lymph nodes and the spleen in order to study lymphocyte phenotypes and OVA-specific CD8$^+$ T cells functionality. Staining with OVA-specific multimers reveals a strong OVA CD8$^+$ T cell tumor infiltration for KBMA S54-OVA and OSTAB S54-OVA group in contrary to control groups HK S54-OVA and OST S54-Ei (P<0.001 or P<0.0001) (Fig. 2a and 2b). We also looked for OVA-specific CD8$^+$ response in tumor-draining lymph nodes (DLNs) and splenocytes but we discovered that the amount of OVA-specific CD8$^+$ T cells was really weak (<1.5% in CD8$^+$ splenocytes and <0.4% in the tumor-DLN for treated groups, supplementary data Fig. 2e and 2f), probably due to their predominantly tumor localization. Interestingly, the percentage of total tumor-infiltrating CD8$^+$ T cells (based on CD45$^+$ tumor cells) was significantly higher in the group OSTAB S54-OVA (versus KBMA S54-OVA and OST S54-Ei; P<0.01), whereas it was equivalent to the control groups for KBMA S54-OVA (Fig. 2c). This result is not only correlated to the high percentage of OVA-specific CD8$^+$ T cells into the pool of CD45$^+$ tumor cells (supplementary Fig. 2g), but also to an increase of the ratio between CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells (Supplementary Fig.

2h), in particular $CD4^+$ $FoxP3^+$ T_{REG} cells (Fig. 2d). In fact, we observed a significantly higher $CD8^+/CD4^+$ $FoxP3^+$ ratio for OSTAB S54-OVA than with KBMA S54-OVA ($P<0.05$) and control groups ($P<0.05$ or $P<0.01$) (Fig. 2d).

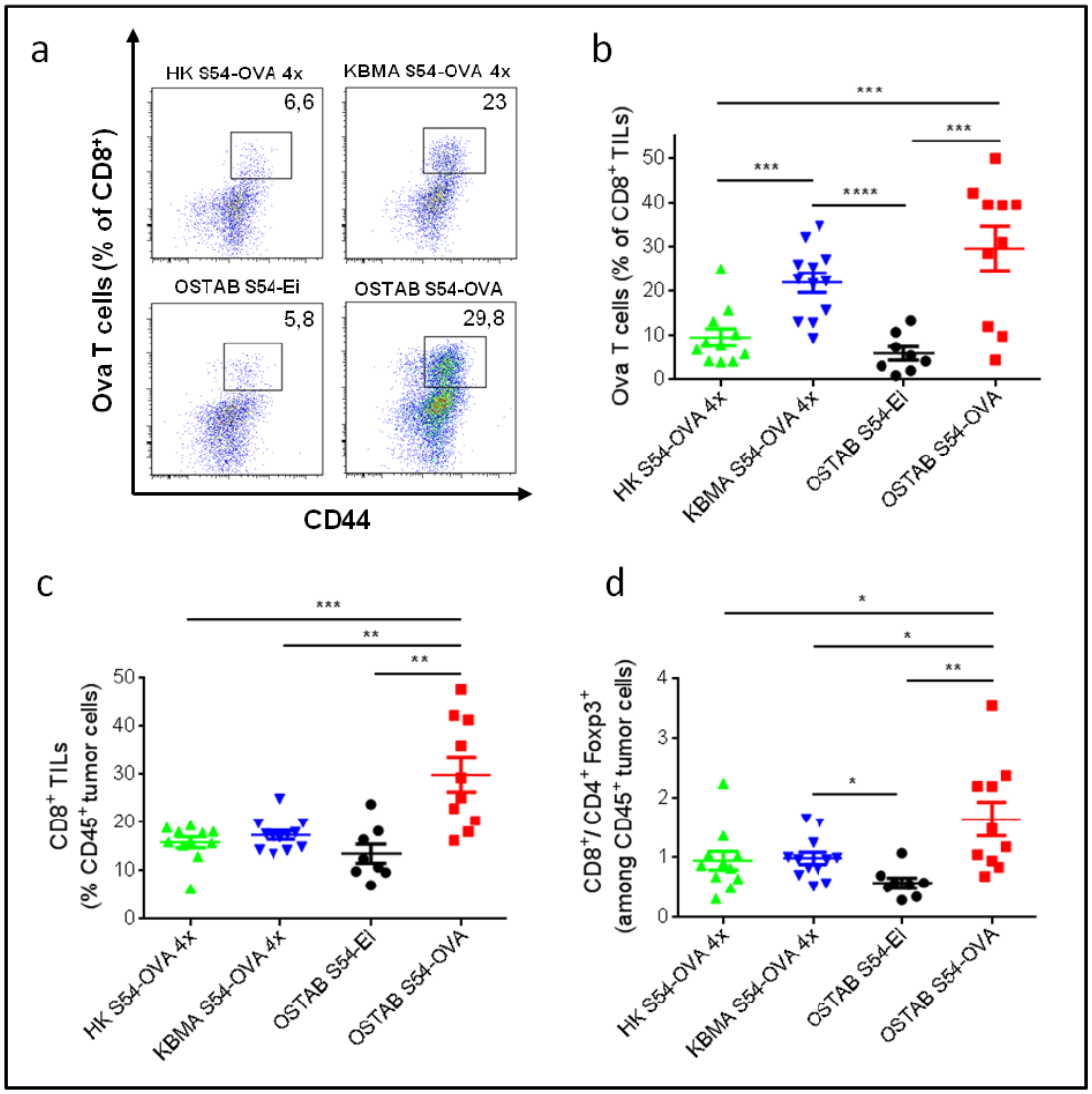


Figure 2: Immunizations with *P. aeruginosa*-OVA vectors allow OVA-specific $CD8^+$ T cells tumor infiltration and favor tumor-killing effector cells within the tumor. Mice were immunized according to the schedule depicted in Fig. 1a.Tumors were harvested at day 21 (when tumor growth follow-up was stop in Fig.1b) **(a and b)** OVA-specific CD8+ T cell tumor infiltration quantified by flow cytometry in tumors. **(a)** Representative flow-cytometric profile of each group indicating percentage of activated $CD44^+$ OVA $CD8^+$ T cells. **(b)** Mean percentage of activated $CD44^+$ OVA $CD8^+$ T cells through CD8+ TILs for each group. **(c)** Total $CD8^+$ T cells in the tumor infiltrate (gated on $CD45^+$ tumor cells) **(d)** Ratio between the total $CD8^+$ T cells (gated on tumor $CD45^+$ cells) and T_{REG} cells (% $FoxP3^+$ cells gated on tumor $CD4^+$ cells). *N*=4-6 mice/group. Data are representative of two pooled experiments. Mean ± s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ determined by unpaired Student *t* test.

Next, we tried to evaluate whether tumor-infiltrating OVA-specific $CD8^+$ T cells were functional by staining of intracellular IFNγ and TNFα following culture of tumor cell suspensions with or without immunodominant MHC class I OVA peptide (SIINFEKL) (Fig.3a).

A higher proportion of double-positive stimulated $CD8^+$ T cells was detected for OSTAB S54-OVA vaccinated mice in comparison with control group OSTAB S54-Ei but the difference was not significant (p=0.075) (Fig. 3b). For the KBMA S54-OVA group, we did not observe significant difference with controls for double-positive cells. On the other hand, we observed an increase of IFNγ single-positive cells only for OSTAB S54-OVA group following restimulation ($P<0.05$), but none difference in the single-positive TNFα cells between the groups. The basal IFNγ production we observed in control groups with or without peptide stimulation may be related to activation of nonspecific-antigen $CD8^+$ T cells present in the tumor.

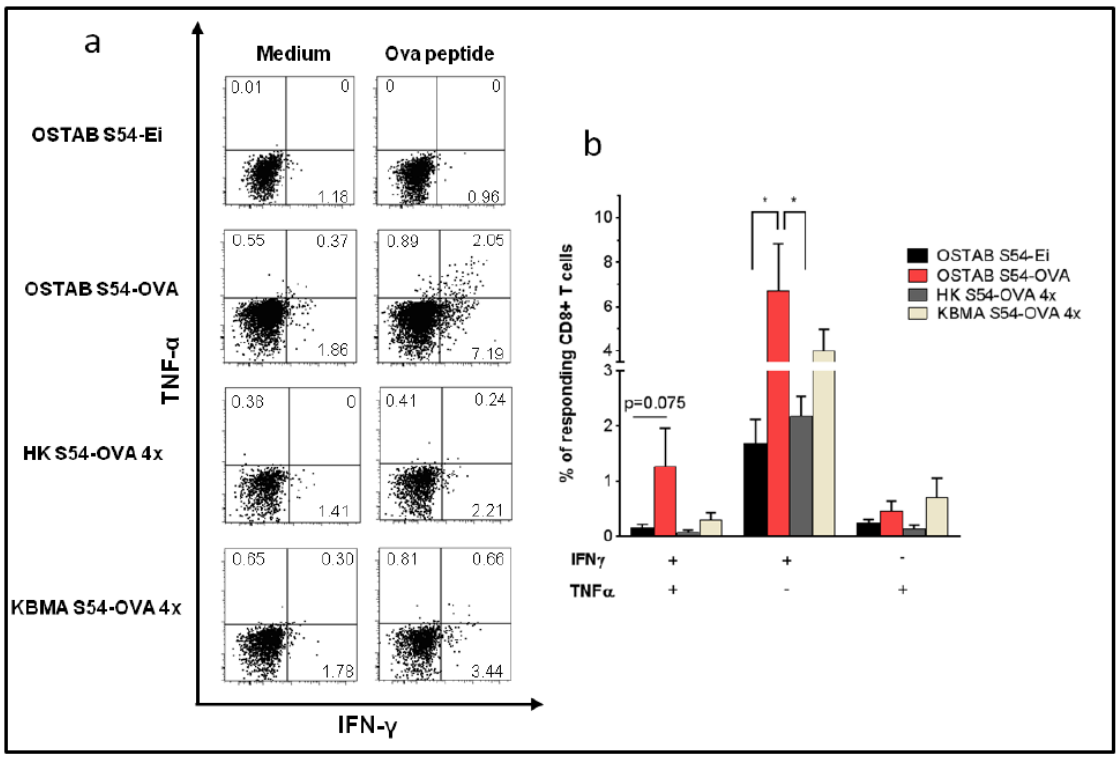


Figure 3: Functionality of OVA $CD8^+$ TILs. Mice were immunized according to the schedule depicted in Fig. 1a.Tumors were harvested at day 21 (when tumor growth follow-up was stop in Fig.1b) and cultured with or without SIINFEKL peptide ($OVA_{257-264}$ peptide). After 4 hours, cells were stained with a fixable viability marker and anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8 antibodies and then fixed and stained with anti-IFNγ and anti-TNFα anti-

bodies. **(a)** FACS analyses on $CD8^+$ TILs representative of an immunized mouse in each group. **(b)** Frequencies of OVA-peptide restimulated cell populations in groups of mice. Mean ± s.e.m. One experiment representative of 2. * $P<0.05$ determined by unpaired Student *t* test.

Live or KBMA P. aeruginosa-OVA vectors induce a long-term tumor protection in a prophylactic setting

A good immunotherapy protecting from tumor relapse lies on its ability to induce a long-lasting tumor specific CD8+ T cells response. We assessed this critical point by injecting B16-OVA tumor cells at day 50 or 85 after the last immunization with *P. aeruginosa* vectors and we pooled the two experiments to study survival (Fig. 4a). Control groups HK S54-OVA and OSTAB S54-Ei develop tumors and had a median survival of respectively 29 and 22 days, whereas 100% and 72.7% of mice survived and stay tumor-free beyond 70 days after tumor challenge respectively in OSTAB S54-OVA and KBMA S54-OVA group (Fig. 4b).

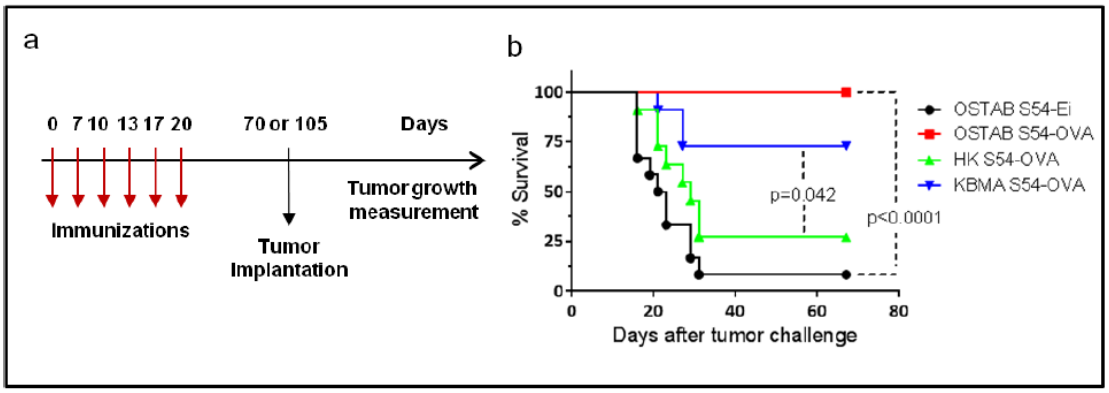


Figure 4: Long-term protection of *P. aeruginosa*-OVA against B16-OVA melanoma. (**a**) Experimental setting. Mice have been injected 6 times at d0, d7, d10, d13, d17, d20 and challenged with $2x10^5$ B16-OVA cells 50 or 85 days after last immunization. Tumor growth was monitored every 2 days and mice were euthanized when tumor reach $150mm^2$. (**b**) Percent survival (based on $150mm^2$ tumors) of mice challenged with tumor during the memory phase. N=5-6 mice per group. The two experiments (tumor challenge at day 70 and day 105) were pooled to represent the survival curves. *P*value of survival difference in different groups are determined with the Log Rank test.

Live or KBMA P. aeruginosa-OVA vectors elicit a stable pool of predominantly long-lived and CD8$^+$ T effector memory cells

With regard to the previous results, we were interested in the T CD8$^+$ memory response linked to *P. aeruginosa* vaccines. First, we focused on the kinetic profile analysis of OVA-specific CD8+ T cells in the blood. For groups, we obtained a similar OVA response (2.2% vs 1.8% of CD44+ OVA CD8+ T cells through CD8+ T cells) at day 6 (Representative flow-cytometric profile at day 6 in Fig. 5a) and no response for negative-control Ei and HK-OVA group. Then, we looked for the responses of OSTAB S54-OVA and KBMA S54-OVA vaccinated mice and observed that the number of cells increased continuously from the first bacterial inoculation and during the immunization period (which ends at day 20, as described in Fig. 4a) to reach a maximum at day 28 for the OSTAB S54-OVA group (Fig. 5b). Surprisingly for KBMA S54-OVA group, the number of OVA CD8$^+$ T cells increased similarly to OSTAB S54-OVA after the first immunization and then stagnate at a level 5 times lower than OSTAB S54-OVA until day 28. This phase was followed by the contraction phase, where the number of OVA CD8$^+$ T cells decreased widely in the two groups. Considering that a stable mouse memory CD8$^+$ T cells was reached about 40 days after the last immunization [14], we performed a challenge with B16-OVA tumor cells at day 70 (50 days after last immunization), which caused a significant expansion (P=0.031, paired Student t test) of OVA CD8+ T cells 8 days after tumor implantation only in the group OSTAB S54-OVA (Fig. 5b).

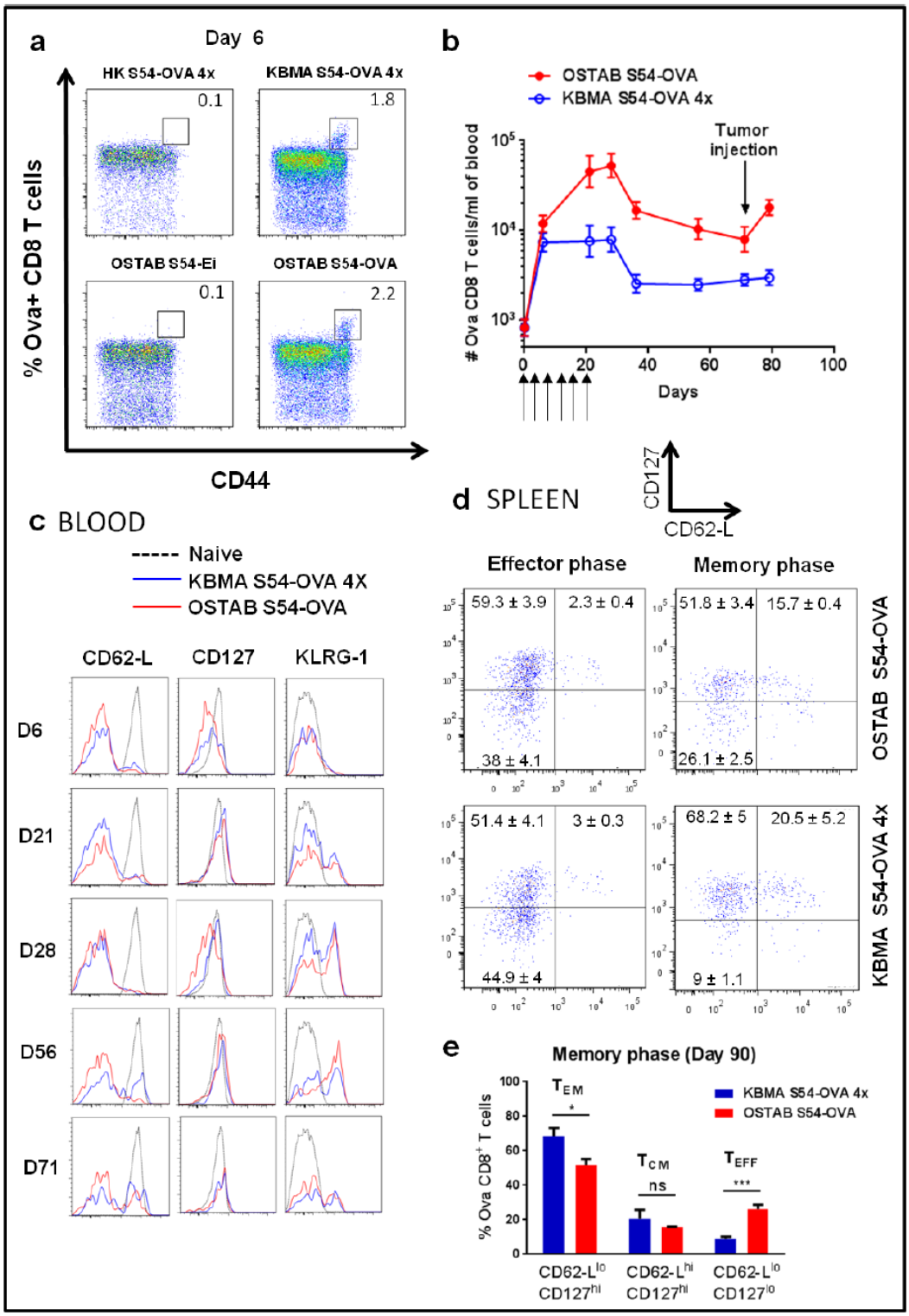


Figure 5 : Kinetic of OVA CD8⁺ T cells and expression of memory markers induced by *P. aeruginosa-OVA* vectors. Mice were vaccinated according to the schedule presented in Fig. 4a. (**a**) Representative flow-cytometric profile of different group at day 6, indicating percentage of OVA CD8⁺T cells in the blood. (**b**) Kinetic profile of OVA CD8⁺ T cells in the blood. Immunizations are represented with arrows. Tumor cells were injected at day 70. N=5-6 mice per group per time point. Mean±s.e.m. The same mice were followed during all the experiment. After tumor challenge, the absolute number of OVA CD8+T cells in the OSTAB S54-OVA group

increased significantly (P=0,031by paired Student t test). (**c**) Expression of CD62-L, CD127 and KLRG-1 markers assessed over time by flow cytometry by gating on $CD8^+$ $CD44^+$ OVA T cells from blood. (**d**) Representative flow-cytometric profile of co-expression of CD62-L and CD127 markers by gating on $CD8^+$ $CD44^+$ OVA T cells from splenocytes at effector phase (day 29) and memory phase (day 90). Numbers indicate percentage within each quadrant (mean ± s.e.m.). (**e**) Comparison of CD62-L and CD127 expression patterns of memory OVA $CD8^+$ T cells in splenocytes upon immunization with OSTAB S54-OVA or KBMA S54-OVA 4x. T_{EM} : effector memory OVA-specific CD8+ T cells; T_{CM} : central memory OVA-specific CD8+ T cells; T_{EFF} : effector CD8+ T cells. Mean ± s.e.m. *P<0.05, ***P<0.001 by unpaired Student t test.

To study the change of phenotype of OVA-specific CD8+ T cells over time in the blood, we followed the evolution of CD127 (IL-7Rα), which is expressed on naive and memory $CD8^+$ cells [14], CD62-L and KLRG-1, a marker of senescence (or advanced state of differentiation) expressed on effector cells but absent on memory and naive $CD8^+$ T cells [24] (Fig.5c). In comparison with naive $CD8^+$ T cells, both OVA-specific CD8+ cells from OSTAB S54-OVA and KBMA S54-OVA group had firstly a typical effector phenotype with a short down-regulation of CD127 (at day 6), as previously described [14], followed by a progressive evolution towards predominantly effector-memory phenotype at day 71 ($CD62\text{-}L^{low}$ $CD127^{hi}$ $KLRG\text{-}1^{low}$). During the period of transition, we measured an increasing proportion of $KLRG\text{-}1^{hi}$ cells corresponding to senescent cells which are devoted to die, whereas only few memory cells stayed $KLRG\text{-}1^{low}$ at day 71. We also investigated the OVA-specific CD8+ T cell response in splenocytes at effector (day 29) and memory phase (day 90), which substantiate the development of an effector-memory response ($CD62\text{-}L^{low}$ $CD127^{hi}$) following immunizations with *P. aeruginosa*-OVA vectors (Fig. 5d). However, we measured a higher proportion of OVA-specific cells in the effector phase (T_{EFF}, $CD62\text{-}L^{low}$ $CD127^{low}$) in the OSTAB S54-OVA groups, even 70 days after the last immunization (P<0.001, versus KBMA S54-OVA) (Fig. 5e) and as a consequence, a significant lower percentage of T_{EM} cells (P<0.05, versus KBMA S54-OVA). We noticed the presence of a similar T_{CM} pool in each group represented by about 15 to 20% of CD8+ T cells (Fig. 5e).

Live or KBMA P.aeruginosa-OVA memory CD8$^+$ T cells are highly functional but live bacteria are more potent to induce IL-2 production.

Specific antigen response of memory cells (day 90) were measured in splenocytes by restimulation of OVA-specific CD8$^+$ T cells with the immunodominant MHC class I OVA epitope (SIINFEKL) to assess their effector functions. In the groups OSTAB S54-OVA and KBMA S54-OVA, cells responded strikingly to restimulation by IFNγ, TNFα and IL-2 production and expression of CD107a as a marker of CD8$^+$ T cell degranulation (Fig.6a). However, although OVA-specific cells presented a high degree of polyfunctionality, we noticed difference between the two groups (Fig. 6b). In the OSTAB S54-OVA group, more responding cells had 4 functions (19% vs 8% in the KBMA S54-OVA group) but the proportion of cells with 3 functions is weaker (32% vs 79% in the KBMA S54-OVA group) in favor of monofunctional cells (40% vs 2% in the KBMA S54-OVA group). Interestingly the number of responding CD8$^+$ T cells is higher for KBMA group after restimulation but it seems that these cells are less potent to produce IL-2 than cells from OSTAB S54-OVA group (Fig. 6c).

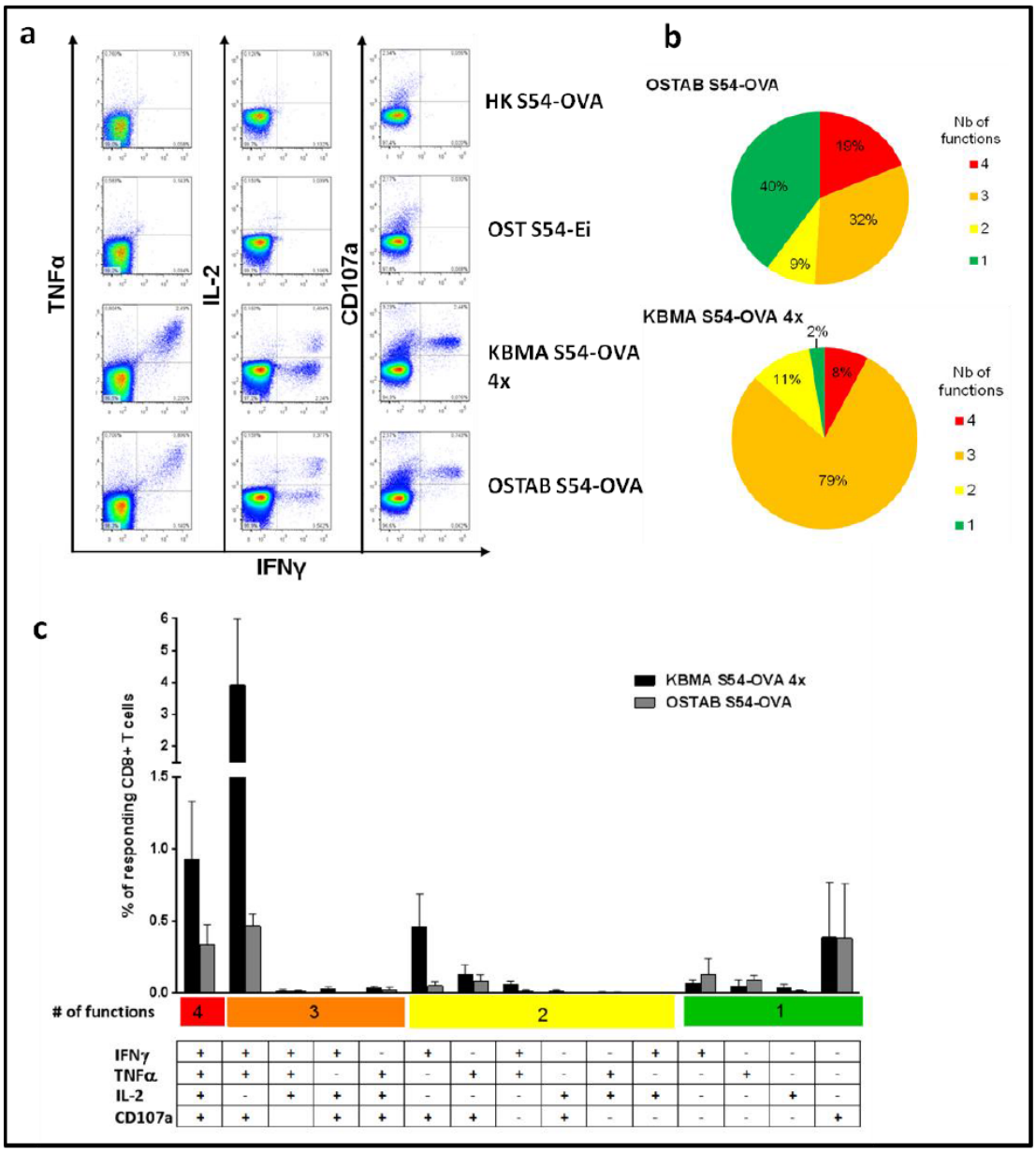


Figure 6 : Functional characterization of memory CD8$^+$ T cells induced by *P.aeruginosa*-OVA vectors. Simultaneous production of the cytokines IFN-γ, TNF-α, and IL-2 as well as degranulation (CD107a) was assessed at day 70 after last immunization (schedule in Fig.4a) after 4 hours of $OVA_{257-264}$ peptide stimulation. **(a)** Representative flow-cytometric analysis of IFN-γ, TNF-α ,IL-2 and CD107a expression by splenic CD8$^+$ T cells following stimulation. **(b)** Pie chart representations of the functional CD8$^+$ T cell profiles. Each slice of pie represents the percentage of cells expressing between 1 and 4 effector functions among CD8+ responding T cells. In the pie charts, the total percentage of responses with a given number of functionalities is color coded as follows: green, 1 functionality; yellow, 2 functionalities; orange, 3 functionalities; and red, 4 functionalities. **(c)** Bar diagram indicating the frequency of CD8$^+$ T cells secreting each of the 15 combinations of IFN-γ, TNF-α ,IL-2 and CD107a according to the diagram shown underneath the bar graphs. N= 5 or 6 mice per groups.

Discussion

In the present study, we used the B16-OVA tumor model to further characterize T $CD8^+$ antitumor immune response following immunization with two live and Killed But Metabolically Active *P.aeruginosa*-OVA vectors in terms of tumor infiltration and long-term protection. We demonstrated firstly that we could significantly slowdown tumor growth in a therapeutic model in both treated groups, which was associated with a strong tumor infiltration of OVA-specific CD8+ T cells. Then we tried to determine the functionality of these cells by restimulation with OVA-specific peptide directly on the tumor cells suspension. We obtained only a slight TNFα and IFNγ production, even in mice with high number of OVA-specific $CD8^+$ TILs. This surprising result may be explain as follows : (i) the tumor immunosuppressive environment leads to OVA-specific $CD8^+$ T cells anergy, albeit we observed clinical response little consistent with this hypothesis; (ii) only a small proportion of APCs is present in the tumor and OVA-peptide is weakly displayed by MHC class I complex to $CD8^+$ T cells during restimulation. Actually, this latter hypothesis could justify why we did not found peptide-specific restimulation of TILs directly on tumor cells suspension in the literature, excepted restimulation methods using APCs loaded with epitope peptides

Furthermore, we discovered, especially for the live OSTAB S54-OVA vector, that the antigen-specific response was also accompanied by a significant rise of the proportion of total CD8+ T cells among TILs and accordingly a shift in the balance T $CD8^+$/CD4+T_{REG} in favor of effector $CD8^+$ cells. Although these results did not impact the clinical response (tumor growths are the same in KBMA and live *P. aeruginosa* vectors), we hypothesize that the important prevalence of antigen-specific $CD8^+$ T cells in the tumor could induce a potent global antitumor response with amplification of others tumor antigen-specific T CD8+ responses mediated by antigens spreading. Otherwise, attenuated live bacterial vectors like *Listeria* or *Salmonella sp.* have been shown to accumulate in tumors when administrated in-

travenously and have also been used as anticancer agents because of their natural cytotoxicity [25,26]. The presence of bacteria into the tumor may promote inflammatory environment and then may exert an antitumoral effect. We previously demonstrated that OSTAB strain was ubiquitously found in different organs 24h after a subcutaneous injection [10].

In a second part, we explored the antigen-specific $CD8^+$ memory response and we showed that antigen-specific $CD8^+$ T cells, induced by *P.aeruginosa*-OVA vectors evolve to a pool of predominantly effector-memory phenotype (CD62-$L^{low}$$CD127^{hi}$) with high effector function. This long-lasting response was correlated to a potent protection of mice against a tumor challenge at the memory phase. Interestingly, s.c tumor injection during memory phase induced a rapid (8 days later) and profound remobilization of OVA CD8+ T cells only for OSTAB S54-OVA group, which could be correlated to the ability of OVA-specific cells induced by this bacterial strain to produce more IL-2 after restimulation. Besides, we distinguished a difference in the memory phenotype of OVA CD8+ T cells induced by the two vectors. It seems that OSTAB strain elicited an extended effector phenotype (about 26% of cells versus 9% for KBMA bacteria), even at the memory phase. It may be explained by a persistence of the live OSTAB bacteria in the organism, which may maintain a pool of antigen-specific CD8+ effector cells. Overall, tumor protection obtained during the memory phase with the two strains could be mediated by different means : KBMA may induce a large pool of fully functional cytotoxic T cells with low proliferation capabilities, whereas OSTAB vector may be able to induce a lower pool of functional cells but with more potent abilities to expand. Although it was previously demonstrated that T_{CM} phenotype was better than T_{EM} to mediate protection against infectious or tumor challenge, because of high proliferation property [18,19,27,28], this dogma stays a source of controversy. Recently Olson *et al.* demonstrated that poorly proliferative effector-phenotype memory CTL ($CD127^{int}$ CD62-L^{low} KLRG-1^{hi}) were capable of high protection, with strong cytolytic functions, to system-

ic secondary challenges with either *L.monocytogenes* or vaccinia virus[29]. Thus, the paradigm T_{CM} versus T_{EM} seems to be more complicated, with the intervention of various subsets which could depend on the pathogens or the tumor[30]. In the study of Stark *et al.* they used *Listeria monocytogenes*-OVA and *Salmonella typhimurium*-OVA bacterial vectors to study how the phenotype difference in $CD8^+$ T-cells may modify protection against tumor challenge[19]. They demonstrated that long-lasting antitumor response was better when antigen was delivered with *L.monocytogenes,* which developed mainly T_{CM} response, rather than *S. typhimurium,* which developed a predominantly T_{EM} response. Finally, they suggested that cancer vaccines should be selected based on their ability to induce predominantly $CD8^+$ T_{CM} protective memory cells, rather than their effector properties.

Nevertheless, in our work, we demonstrated a strong efficacy of T_{EM} response in the same tumor model than Stark *et al.* after immunizations with *P. aeruginosa*-OVA vectors. Then the true quality of the memory response may be strongly dependent on the vector used and the induced host response. The only observation of T_{CM} or T_{EM} phenotype could be not sufficient to conclude on the efficacy of one or another vector.

Cancer vaccines aim at overcoming immunotolerance against tumor antigen(s) and at eliciting strong antitumor $CD8^+$ T cell response(s). Several strategies, like adjuvantized peptide-based vaccine, DCs vaccine or *in vivo* delivery vectors had already achieved this fundamental step. Nevertheless, many of them induced only a limited response against the tumor growth. It seems that the modulation of the *in vivo* delivery approach constitute an important route of investigation to improve the quality of the antitumor immune response. During the last decade, bacterial vectors for *in vivo* tumor-antigen delivery demonstrated their attractive properties. They are natural adjuvants and their lifestyle contributes to intracellular delivery of full-length protein tumor antigen to immune host cells (in particular APCs), skirting the limits of MHC restriction and the choice of $CD8^+$ and/or $CD4^+$ epitope

peptides. *P. aeruginosa* is one of this recombinant bacterial vector that had already proved to elicit protective response in tumor models [8,10,13]. It can stimulate potently the innate immune system through TLRs activation and induce NLRC4 inflammasome leading to pro-inflammatory reaction and release of inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 and GM-CSF [31]. Less is known about adaptative response following *P. aeruginosa* injection but it was recently reported a *P. aeruginosa*-specific memory T helper responses Th1, Th17 and Th22 conferring protection to the bacteria [32,33].

Overall, the antitumor therapeutic efficacy of our *P. aeruginosa* vaccines looks promising and we could certainly improve their effects by association with chemotherapy or radiotherapy but also with new immunomodulatory agents (i.e. anti-PD-1 or ant-CTLA-4 monoclonal antibodies).

Immune response to vaccines is nowadays not totally understood. Preclinical murine models could help to decipher between the properties of different vectors but many work remain to be done in order to define the hallmarks of a good response measured in mice that could predict efficacy and safety for human use.

Conflicts of interest

DH, LB, ALG, BP, and BT declare competing financial interest. ALG, BP and BT are the cofounders of APCure, a start-up that produces immunotherapy treatments for patients with cancer. DH and LB are members of APCure.

Acknowledgments

The authors thank Pierre Champelovier, Erwann Ventre and David Laurin for the flow cytometry analysis. This work was supported by the GEFLUC of Grenoble (Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer) and the Ligue contre le cancer (comité Isère).

References

1. Kirkwood, J. M. *et al.* Immunotherapy of cancer in 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **62,** 309–335 (2012).
2. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363,** 411–422 (2010).
3. Topalian, S. L., Weiner, G. J. & Pardoll, D. M. Cancer immunotherapy comes of age. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29,** 4828–4836 (2011).
4. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480,** 480–489 (2011).
5. Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B. & Le Gouëllec, A. Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev. Vaccines* **12,** 1139–1154 (2013).
6. Rothman, J. & Paterson, Y. Live-attenuated Listeria-based immunotherapy. *Expert Rev. Vaccines* **12,** 493–504 (2013).
7. Polack, B. *et al.* Protein delivery by Pseudomonas type III secretion system: Ex vivo complementation of p67(phox)-deficient chronic granulomatous disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275,** 854–858 (2000).
8. Epaulard, O. *et al.* Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14,** 656–661 (2006).
9. Derouazi, M. *et al.* Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2. *Bioeng. Bugs* **1,** 51–60 (2010).
10. Le Gouëllec, A. *et al.* A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21,** 1076–1086 (2013).
11. Bichsel, C. *et al.* Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PloS One* **6,** e16465 (2011).
12. Bichsel, C. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell. Reprogramming* **15,** 117–125 (2013).
13. Wang, Y. *et al.* Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **35,** 223–234 (2012).
14. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4,** 1191–1198 (2003).
15. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* **31,** 137–161 (2013).
16. Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P. & Oxenius, A. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175,** 4686–4696 (2005).
17. Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 247–258 (2008).
18. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* **4,** 225–234 (2003).
19. Stark, F. C., Sad, S. & Krishnan, L. Intracellular bacterial vectors that induce CD8(+) T cells with similar cytolytic abilities but disparate memory phenotypes provide contrasting tumor protection. *Cancer Res.* **69,** 4327–4334 (2009).
20. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313,** 1960–1964 (2006).

21. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 18538–18543 (2005).
22. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **348,** 203–213 (2003).
23. Finn, O. J. Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.* **358,** 2704–2715 (2008).
24. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27,** 281–295 (2007).
25. Forbes, N. S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **10,** 785–794 (2010).
26. Kim, S. H., Castro, F., Paterson, Y. & Gravekamp, C. High efficacy of a Listeria-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action. *Cancer Res.* **69,** 5860–5866 (2009).
27. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 9571–9576 (2005).
28. Klebanoff, C. A., Gattinoni, L. & Restifo, N. P. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* **211,** 214–224 (2006).
29. Olson, J. A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S. C. & Hamilton, S. E. Effector-like $CD8^+$ T cells in the memory population mediate potent protective immunity. *Immunity* **38,** 1250–1260 (2013).
30. Williams, M. A. Instant Recall: A Key Role for Effector-Phenotype CD8+ Memory T Cells in Immune Protection. *Immunity* **38,** 1090–1091 (2013).
31. Cohen, T. S. & Prince, A. S. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute P. aeruginosa pneumonia. *J. Clin. Invest.* **123,** 1630–1637 (2013).
32. Bayes, H. K., Bicknell, S., MacGregor, G. & Evans, T. J. T helper cell subsets specific for Pseudomonas aeruginosa in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. *PloS One* **9,** e90263 (2014).
33. Wu, W. *et al.* Th17-stimulating protein vaccines confer protection against Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186,** 420–427 (2012).

Supplementary data

Figure 2e : Mean percentage of activated CD44+ OVA-specific CD8+ T cells through $CD8^+$ cells in tumor-draining lymph nodes analysed by flow cytometry for each group. N=3-6 mice/group. Mean ± s.e.m.

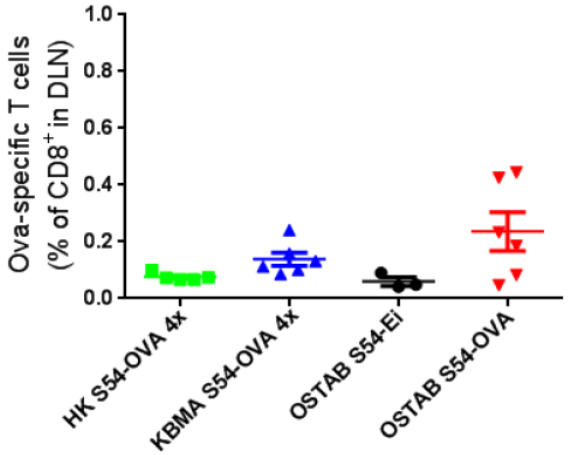


Figure 2f : Mean percentage of activated CD44+ OVA-specific CD8+ T cells through $CD8^+$ cells in splenocytes analysed by flow cytometry for each group. N=5-6 mice/group. Mean ± s.e.m.

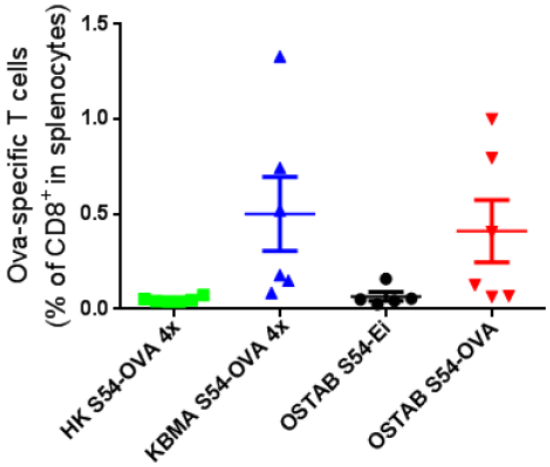


Figure 2g : Mean percentage of activated CD44+ OVA-specific CD8+ TILs through $CD45^+$ tumor cells analysed by flow cytometry for each group. N=4-6 mice/group. Data are representative of two pooled experiments. Mean ± s.e.m. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, determined by unpaired Student *t* test.

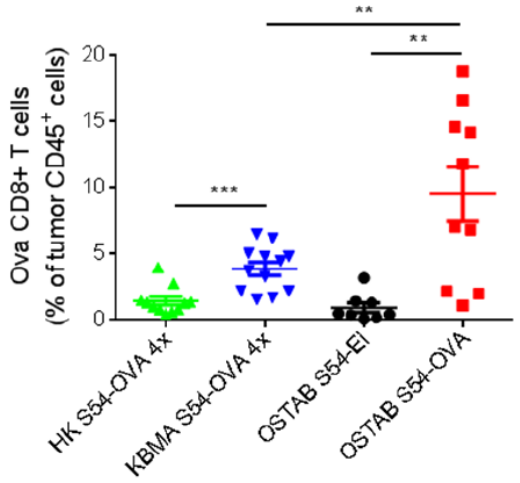
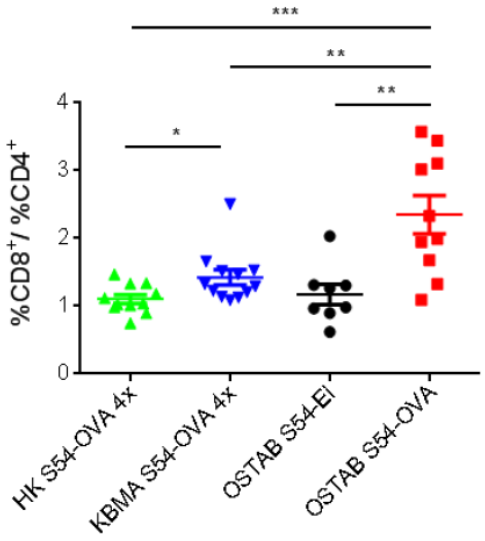


Figure 2h : Ratio between the % of total CD8+ T cells (gated on tumor CD45+ cells) and the % of total CD4+ T cells (gated also on tumor CD45+ cells). N=4-6 mice/group. Data are representative of two pooled experiments. Mean ± s.e.m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, determined by unpaired Student *t* test.



PARTIE III

APPLICATION DE LA TECHNOLOGIE BACVAC À L'ANTIGENE ANHYDRASE CARBONIQUE 9 (AC9) ET MISE AU POINT D'UN MODELE TUMORAL MURIN EXPRIMANT L'AC9 HUMAINE

A. INTRODUCTION

Un important travail de développement de la technologie a été effectué depuis sa mise au point comme vecteur pour l'immunothérapie anti-tumorale spécifique. Deux souches fortement atténuées, dont l'efficacité anti-tumorale a été validée, et pouvant être utilisées pour une étude clinique sont maintenant disponibles. Le schéma de vaccination a également été mieux défini et nous avons pu démontrer que cette approche pouvait induire une réponse forte contre un antigène de tumeur et conférer une protection à long terme. Cependant la grande majorité des résultats acquis *in vitro* ou *in vivo* sont basés sur l'utilisation du modèle antigénique ovalbumine. L'intérêt de ce modèle est de pouvoir bénéficier de nombreux outils pour caractériser la réponse immune spécifique (multimères, clone T CD8+ spécifique, épitopes immunodominants CMH I et CMH II connus, etc…) mais également d'évaluer l'efficacité de la vaccination dans différents modèles tumoraux murins fréquemment utilisés et exprimant l'ovalbumine. Notre objectif est de pouvoir transposer ces résultats avec des antigènes associés ou spécifiques de tumeurs humaines et développer ces produits pour effectuer des essais chez l'homme. Quelques données encourageantes ont déjà été générées en modèle de glioblastome murin en immunisant les souris avec des souches exprimant l'antigène tyrosinase TRP-2 (*tyrosinase related protein*-2) et gp100 (*glycoprotein* 100) (Derouazi et al., 2010; Wang et al., 2012).

Notre choix s'est porté sur un antigène associé à de nombreuses tumeurs : l'anhydrase carbonique 9. Cette enzyme membranaire exprimée largement dans les tumeurs hypoxiques semble être une cible d'intérêt pour le traitement des tumeurs solides. Elle est notamment exprimée de manière constitutive dans le carcinome rénal à cellules claires et absente sur les cellules saines adjacentes. Enfin elle n'est retrouvée que sur très peu de tissu sain, excepté au niveau du tractus gastro-intestinal.

Nous avons donc procédé tout d'abord à l'élaboration de plusieurs souches bactériennes candidates capables de produire et d'exprimer des fragments de l'AC9 humaine puis au développement d'un modèle tumoral exprimant l'antigène afin d'effectuer des tests *in vivo* sur souris.

B. MATERIELS ET MÉTHODES

I. Elaboration des constructions plasmidiques

La vectorisation de l'antigène est réalisée par fusion traductionnelle de la séquence de l'antigène avec celle correspondant aux 54 premiers acides aminés de la toxine ExoS (*exoS54*), sous la dépendance du promoteur d'ExoS. Cette séquence permet la sécrétion de la protéine de fusion. Pour réaliser cette fusion, on utilise le plasmide pEAiS54 (*cf* partie D.III. de l'introduction bibliographique). Les séquences *CDCA9* (1068pb), *CD2CA9* (906pb), *tCA9* (693pb) et *sCA9* (393pb) de l'anhydrase carbonique 9 ont été amplifiés par PCR à partir de la séquence du gène humain codant l'AC9, obtenue par RT-PCR sur les ARNm de cellules tumorales HeLa cultivées à confluence (cancer du col de l'utérus). La lignée HeLa est connue pour surexprimée l'anhydrase carbonique 9 lorsque les cellules en culture atteignent une confluence élevée (situation hypoxique) (Pastoreková et al., 1992).
Un clonage est ensuite effectué dans le plasmide pEAiS54, en aval de la séquence *exoS54* en utilisant les sites correspondants (Tableau 6). On obtient ainsi les plasmides pEAiS54 CDCA9, pEAIS54 CD2CA9, pEAIS54 tCA9 pEAIS54 sCA9, validés par séquençage.

Construction	Amorces en 5'	Amorces en 3'	Sites de restriction	Taille
CDCA9	GCGCTAGCCCACTGGGCGAGGAG	GCAGATCTTCAGTCACCAGCAGCCAGG	NheI/BglII	1068pb
CD2CA9	GCGCTAGCCTACCTACTGTTGAGGCTCCTG	GCAGATCTTCAGTCACCAGCAGCCAGG	NheI/BglII	906pb
tCA9	GCGGATCCCCCCGGGTGTCCCCAGC	GCGCATGCTCACTTCCGAGCGACGCAGCCT	BamHI/SphI	693pb
sCA9	GCGCTAGCCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCG	GCAGATCTTCAGACACCCTGGGCACAGGG	NheI/BglII	393pb

Tableau 6 : Amorces et sites de restriction enzymatique utilisés pour l'amplification et le clonage de différentes séquences codant des fragments de l'AC9 humaine dans le plasmide PEAI S54.

Ces différentes séquences ont été conçues de manière à avoir des protéines comportant des épitopes T CD8+ prédits ou décrits chez les souches murines C57BL/6 et Balb/c (Kim et al., 2007a; Shimizu et al., 2003; Wang et al., 2010) et chez l'humain (Bleumer et al., 2007b; Uemura et al., 2006; Vissers et al., 1999) (Tableau 7).

Epitopes humains

Protéine	Séquence (AA)	Epitope HLA-A.02.01 9-mer	Position	Score /36	Epitope HLA-A.24.02 9-mer	Position	Score /36
CDCA9	59-414	LLGFQLPPL	182	26	RYFQYEGSL	323	20
CD2CA9	113-414	GLAVLAAFL	271	26	AYEQLLSRL	288	20
tCA9	150-380	QLLSRLEEI	291	26	EYRALQLHL	219	20
		HLSTAFARV	254	22			
		QLAAFCPAL	169	26			
		FQLPPLPEL	185	23			
		RLRNNGHSV	194	23			
		TLPPGLEMA	205	22			
		GRPGGLAVL	267	21			
		LSAKQLHTL	351	21			
		CAQGVIWTV	336	22			
		VLAAFLEEG	274	20			
		PLNGRVIEA	380	20			
		QLHTLSDTL	355	23			
sCA9	210-340	HLSTAFARV	254	22			
		GLAVLAAFL	271	26			
		VLAAFLEEG	274	20			
		GRPGGLAVL	267	21			
		QLLSRLEEI	291	26			

Epitopes murins

Protéine	Séquence (AA)	Epitope H2-Kd 9-mer (souris Balb/c)	Position	Score /36	Epitope H2-Kb 8-mer (Souris C57BL/6)	Position	Score /36	Epitope H2-Db 9-mer (Souris C57BL/6)	Position	Score /36
CDCA9	59-414	RYFQYEGSL	323	23	PGREYRAL	216	23	TQPLNGRVI	378	25
CD2CA9	113-414	AYEQLLSRL	288	22	ENSAYEQL	285	23	WTVFNQTVM	342	24
		EYRALQLHL	219	21				PALRPLELL	175	20
tCA9	150-380	AFCPALRPL	172	20				WTVFNQTVM	342	24
		AFARVDEAL	258	20				PALRPLELL	175	20
sCA9	210-340	RYFQYEGSL	323	23				PALRPLELL	175	20
		AYEQLLSRL	288	22						
		EYRALQLHL	219	21						

Tableau 7 : Epitopes murins ou humains T CD8+, prédits ou décrits dans la littérature, présents dans différentes protéines antigéniques (AC9 humaine tronquée) utilisées pour cette etude. La séquence des protéines ainsi que la position de l'épitope sont indiquées par rapport à la séquence complète de l'AC9 humaine. Les peptides présentés par les complexes H-2Kd ou H-2Db sont des nonamères, alors que ceux présentés par le système H2Kb sont des octamères. Les complexes HLA-A.02.01. et HLA-A.24.02 humains présentent des nonamères. Le score de chaque peptide a été déterminé par la base de données SYFPEITHI (http://www.syfpeithi.de), capable de prédire les motifs peptidiques présentés par différents CMH à partir d'une séquence protéique donnée. A titre d'exemple le peptide fortement immunogène SIINFEKL (OVA) obtient un score de 25 avec ce sytème d'évaluation. Seuls les peptides ayant eu un score > 20 sont présentés dans ce tableau.

II. Etude de la sécrétion des protéines de fusion ExoS54-antigène

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Culture

La souche OST utilisée dans ce travail est un pathogène nécessitant une manipulation en laboratoire P2, avec des règles strictes de confinement. La culture se fait en milieu liquide riche (milieu LB) à 37°C sous agitation constante à 250 rpm. La cinétique de croissance est contrôlée par mesure de la densité optique (DO) à 600nm ; une unité de DO_{600nm} correspond à 5.10^8 bactéries par millilitre de milieu.

La culture sur milieu solide est réalisée en milieu PIA (*Pseudomonas Isolation Agar*®, Difco, BD, Le Pont de Claix, France).

Les milieux cités précédemment sont stérilisés par autoclavage avant utilisation.

La carbenicilline est l'antibiotique utilisé à une concentration de 300 µg/ml en milieu liquide et 600 µg/ml en milieu solide pour effectuer la sélection des souches transformées par le plasmide pEAIS54. Le plasmide porte en effet le gène de la *β*-lactamase, conférant une résistance des bactéries à la carbenicilline.

Transformation par un plasmide

A partir d'une culture O/N en milieu liquide, les bactéries sont centrifugées puis lavées 2 fois dans une solution de sucrose 300 mM et remises en suspension dans cette même solution. Les bactéries sont ensuite incubées 30 minutes sur glace avec environ 25 ng d'ADN plasmidique, puis soumises à électroporation (application d'un courant de 1800V pendant 5 ms) dans une cuvette adaptée (système ElectroCell Manipulator ECM399 BTX, Genetronic Inc, San Diego, CA). Enfin les bactéries sont remises en culture 1 heure en milieu LB liquide avant étalement sur milieu PIA, contenant 600mg/ml de carbenicilline.

2. Sécrétion des protéines de fusion S54-antigène par le SST3

Le SST3 de *P. aeruginosa* peut être induit par déplétion calcique du milieu de culture.

La souche OST transformée par un plasmide pEAI3S54-antigène est mise en culture dans du LB-Cb à 37°C sous agitation O/N. Les bactéries sont ensuite centrifugées puis remises en culture à une DO_{600nm} = 0,2 dans LB-Cb supplémenté par IPTG 1mM, 5mM EGTA et 20mM $MgCl_2$ pendant 3h à 37°C sous agitation. La supplémentation en EGTA va permettre

« d'ouvrir » artificiellement le canal de sécrétion du SST3 ce qui entraine une activation transcriptionnelle de l'ensemble des gènes sous la dépendance de ExsA et la sécrétion des toxines et/ou des protéines de fusion ExoS54-protéine. L'IPTG vient amplifier ce phénomène en induisant la production d'ExsA. Enfin l'ajout d'ions Mg^{2+} apporte les ions divalents capables de pallier l'absence des ions Ca^{2+}.

3. Etude du surnageant par SDS-PAGE et Western-Blot

Les surnageants de culture sont prélevés à DO égale (afin de pouvoir comparer visuellement sur gel d'électrophorèse les quantités de protéines sécrétées) après centrifugation pendant 10 minutes à 10000g et traités par PCA 15% (acide perchloroacétique) O/N à 4°C afin de précipiter les protéines.

Deux étapes de lavage successives à l'acétone -20°C sont effectuées pour neutraliser le PCA résiduel et récupérer le culot de protéines précipitées. Entre chaque lavage une centrifugation de 20 minutes, 30000g à 4°C est effectuée. Enfin après évaporation de l'acétone, les protéines sont reprises dans 50µL de tampon dénaturant (TrisHCl 50Mm, pH 6,8, β-mercaptoéthanol 10%, SDS 4%, bleu de bromophénol 0.04%, glycérol 40%) et chauffées 5 minutes à 95°C. Un dépôt de 10µl de chaque échantillon de protéines est déposé sur gel ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire, et la migration est ensuite réalisée sur gel dénaturant gradient 4-15% (Ready gel®, Biorad) à 110V dans un tampon Tris Glycine (Biorad).

Un échantillon de protéines sécrétées par une souche OST contenant le plasmide pEAI3S54-vide (la seule séquence S54 est sécrétée) traité de la même manière est déposé sur le gel, comme contrôle.

Le gel est ensuite soit coloré au Bleu de Coomassie pour visualisation des bandes de migration correspondant aux protéines, soit utilisé pour une analyse par Western-Blot. Auquel cas, le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose 0,45µm à l'aide d'un courant de 100mA pendant 1h. Le transfert des protéines sur la membrane est contrôlé par coloration au rouge ponceau. La membrane est ensuite lavée 5 min en agitation douce dans un tampon TBS-tween 20 0,05% (TBS-T) puis un tampon de *blocking* (5% de lait en poudre dissous dans TBS-T) est ajouté pendant 1h afin de saturer les sites non spécifiques. L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-human AC9 (Mab2188, R&D system, Minneapolis) est ensuite directement ajouté au tampon de blocage à la dilution 1/1000 et incuber O/N à 4°C. On lave ensuite 2 fois la membrane avec TBS-T puis on la place pendant une heure dans une solution de TBS-T contenant un anticorps secondaire *goat anti-mouse-*

HRP (Amersham) dilué au 1/5000. Après 3 derniers lavages, on dépose sur la membrane la solution de révélation (ECL®, Amersham).

III. Elaboration d'un modele tumoral murin exprimant l'AC9 humaine

1. Lignées cellulaires Renca et B16F0

La lignée cellulaire Renca (Renal Cell Carcinoma, ATCC® CRL-2947) est dérivée d'un adénocarcinome du cortex rénal développé spontanément chez une souris Balb/c. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO), 10% de serum de veau fœtal (SVF), 0,1mM d'acides aminés non- essentiels (GIBCO), 1mM de pyruvate de sodium et 2mM de L-Glutamine, 1% penicilline-streptomycine et maintenues à 37°C avec 5% de CO_2.
La lignée B16F0 (ATCC® CRL-6322) est dérivée d'un mélanome développé chez une souris C57BL/6. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM Glutamax ™ (GIBCO) contenant 10% de SVF, 1% penicilline-streptomycine et maintenues à 37°C avec 5% de CO_2.

2. Transfection stable par l'AC9 humaine

Electroporation

La séquence de l'AC9 humaine a été clonée dans le vecteur plasmidique pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) entre les sites de restriction enzymatique HindIII et XhoI puis le plasmide pcDNA3.1 hCA9 a été séquencé.
Les cellules Renca et B16F0 ont été transfectées par électroporation du plasmide pcDNA3.1 hCA9 (Cell Line Nucleofactor™ kit V Amaxa Biosystems, Lonza, Cologne, Germany) en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Brièvement, $2x10^6$ cellules ont été resuspendues dans 100µl de tampon de transfection. Différentes quantités du plasmide pcDNA3.1 hCA9 ont été ajoutées (minimum 2µg/ transfection) à la suspension cellulaire et l'échantillon a été electroporé en appliquant le programme T-020. Suite à l'électroporation les cellules ont été réparties dans une plaque 6 puits et incubées O/N dans leur milieu de culture respectif à 37°C, 5% CO_2.
Afin de valider l'efficacité du procédé et le rendement de transfection sur les 2 lignées cellulaires, un plasmide test fourni par le fabricant (pmaxGFP) contenant la séquence de la GFP a également été électroporé.

Expression stable

Les cellules ont été analysées 12 à 16h après transfection par cytométrie en flux (FacsCanto II cytometer, Becton Dickinson) suite à un marquage par un anticorps monoclonal anti-hCA9 (MAB2188, R&D system Minneapolis) puis par un anticorps secondaire F(ab')2 anti-mouse IgG (H+L)-FITC (PN IM0819, BeckmanCoulter).
Le plasmide pcDNA3.1 hCA9 contient une séquence codant la résistance à G418 (Geneticin, GIBCO). La transfection stable des cellules est obtenue en effectuant une pression de sélection par l'ajout de 500µg/ml de G418 dans le milieu de culture pendant 3 semaines. Un tri cellulaire par cytométrie en flux (FacsVantage SE cytometer, Becton Dickinson, Jean-François Mayol, CRSSA, Grenoble, France) est finalement réalisé pour récupérer les cellules exprimant l'AC9 humaine et des clones stables d'expression variable sont générés par dilution limite.
Les cellules transfectées de manière stable sont cultivées systématiquement avec 500µg/ml de G418 pour s'assurer de la conservation de l'expression de l'AC9.

Western Blot

Les lysats cellulaires sont séparés par SDS-PAGE 12 % et transférés sur membrane de nitrocellulose. L'anticorps primaire monoclonal anti-AC9 humaine W75 (dilution 1/1000, fourni par E. Oosterwijk, University Medical Center Nijmegen (UMCN), The Netherlands) puis l'anticorps secondaire anti-IgG souris HRP (1/5000, Amersham) sont incubés successivement avec la membrane puis la révélation est effectuée par chimioluminescence (Amersham).

Immunohistochimie

Les lignées B16F0 et B16F0 hAC9 ont été fixées au formol puis incluses en bloc de paraffine. Plusieurs coupes ont été déparaffinées et incubées avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-AC9 humaine (ab15086, Abcam, Cambridge, UK) à une dilution de 1/50000 pendant 1h à 20°C. Une technique standard en 3 étapes de marquage indirect à l'immunoperoxidase a été réalisée sur un automate Benchmark XT Ventana, à l'aide d'un kit XT UltraView DAB ; la révélation du marquage est réalisée avec le tampon Cell Conditioning (CC1, Tris/Boric acid/EDTA pH8.0) pendant 30 minutes, en suivant les

recommandations du fabricant (Ventana, Tucson, AZ, USA). Les cellules B16F0 non transfectées sont utilisées comme contrôle négatif.

IV. Challenge tumoral et immunomonitoring

Préparation des doses vaccinales

Après une culture bactérienne O/N dans milieu LB-Cb, les bactéries sont centrifugées puis reprises dans du LB-Cb contenant 1mM d'IPTG à une DO_{600nm}=0,2. A DO_{600nm}=1,6 on effectue une centrifugation (10000g, 3min) puis on lave 2 fois avec du tampon PBS stérile. Enfin on dilue les bactéries à $5x10^7$/ml dans du PBS. 100µl sont administrés par voie sous-cutanée dans le flanc gauche. Les souris sont anesthésiées par isoflurane quelques secondes avant injection. Une observation quotidienne est effectuée. Ces souris sont certifiées indemnes de pathogènes spécifiques et alimentées en eau et nourriture au sein de la plate-forme de haute technologie animale (PHTA) de la Faculté de Médecine/Pharmacie de Grenoble. Elles sont maintenues en isolateur puis manipulées sous hotte à flux laminaire pour diminuer les contacts avec l'extérieur. Les expériences réalisées ont été approuvées par le comité pour l'expérimentation animale de l'Université Joseph Fourier (Cometh).

Etude de la réponse immune par ELISpot IFNγ

L'ELISpot (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*) est une technique immunoenzymatique permettant de dénombrer des cellules à partir de leur sécrétion de cytokines. L'objectif est de détecter et quantifier une réponse spécifique des lymphocytes T cytotoxiques dirigée contre l'AC9 humaine *in vivo*.

Des souris naïves (C57BL/6 ou Balb/c) reçoivent 2 ou 3 inoculations de différentes souches bactériennes (OST pEAiS54-CD2CA9, -tCA9 ou -sCA9) à 7 jours d'intervalle (J-21, J-14 et J-7 ou J-14, J-7) à une dose de $5x10^6$ bactéries par injection. A J0, les souris sont sacrifiées et la rate est prélevée. On distribue 4.10^5 splénocytes / puits (milieu RPMI + 10% SVF + 2mM glutamine) dans une plaque ELISpot (Millipore) pré-traitée par des anticorps anti-IFNγ murin. On ajoute 10µg/ml de peptides épitopes de l'AC9 (pool de peptides ou peptide unique, selon la souche murine sur laquelle on travaille) par puits pour effectuer la restimulation les LT CD8+ spécifiques et on incube pendant 16-18h. L'ajout du peptide dans le milieu va activer les lymphocytes T CD8+ spécifiques et induire la sécrétion d'IFNγ, qui se fixe aux anticorps. Le complexe est ensuite révélé par un anticorps biotinylé, puis par la streptavidine liée à une

enzyme hydrolisant un substrat chromogène insoluble. La précipitation localisée de ce substrat génère des tâches colorées ou « immunospots » qui sont comptées par un automate (Bioreader 4000 Pro) (Figure 28).

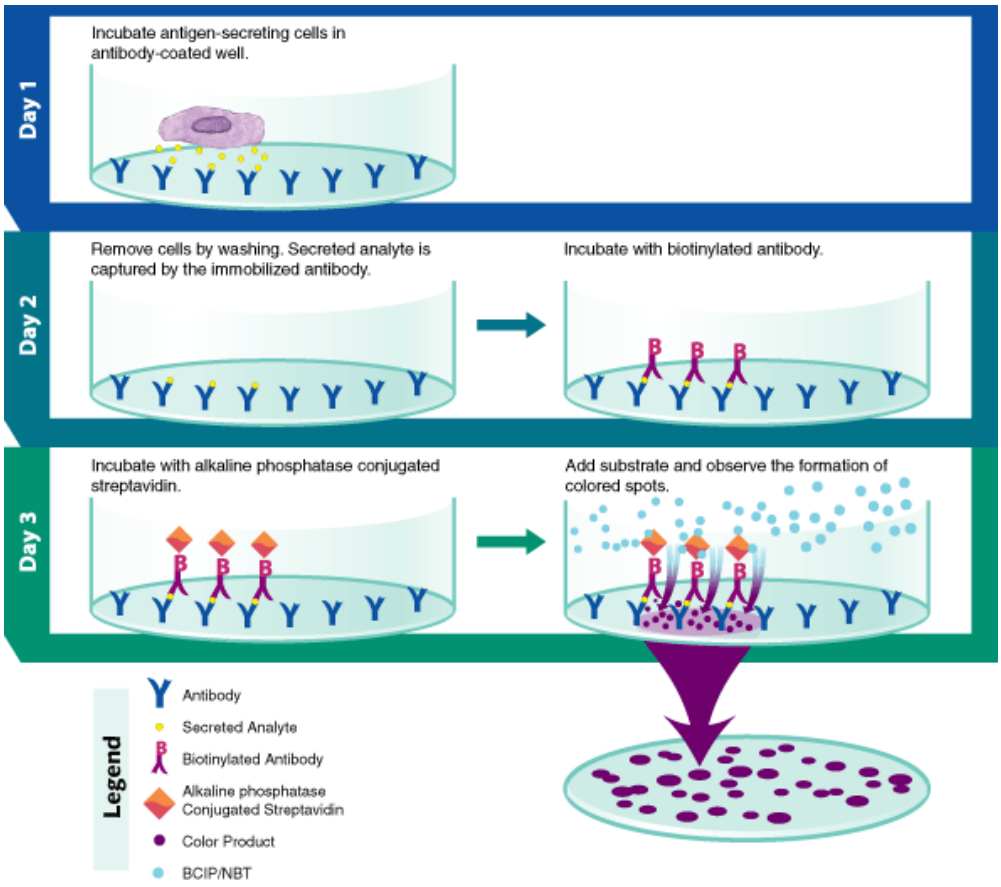


Figure 28 : Principe du test ELISpot. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques stimulés sécrètent de l'IFNγ. On dénombre les spots correspondant aux cellules sécrétant de l'IFNγ.

Les peptides utilisés pour l'étape de restimulation ont été synthétisés par la Plate-Forme Synthèse Nanobio (Rémy Lartia, Grenoble) ou par ChinaPeptides (Shanghai, Chine).

Compte tenu du coût élevé de la synthèse peptidique, seuls les peptides décrits dans la littérature ou avec des scores de prédiction élevés ont été synthétisés pour chaque complexe H-2 (Balb/c ou C57BL/6) :

-Peptides épitopes H-2Db (ChinaPeptides) : TQPLNGRVI, WTVFNQTVM, PALRPLELL

-Peptides épitopes H-2Kd (Plate-Forme Nanobio) : EYRALQLHL, AYEQLLSRL, RYFQYEGSL

Challenge tumoral avec le modèle de mélanome murin B16 AC9 humaine

Des souris C57BL/6 sont immunisées avec différentes souches bactériennes de la même manière que pour l'ELISpot. A J0, $2x10^5$ cellules tumorales B16-hAC9 sont injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit. La croissance tumorale est mesurée tous les 2 jours (largeur x longueur en mm^2). Lorsque la taille tumorale atteint $150mm^2$ (point limite), les souris sont sorties de l'étude et euthanasiées.

C. RESULTATS

I. Evaluation des bactéries « candidates »

L'élaboration d'un vaccin « candidat » a consisté à produire plusieurs constructions de biologie moléculaire permettant la sécrétion par la bactérie de différents fragments de la protéine hAC9.

1. Sécrétion des protéines ExoS54-fragment de l'AC9 humaine

Nous avons travaillé dans un premier temps avec la souche OST, qui est utilisée comme « souche de référence » pour les premiers essais *in vitro* et *in vivo*. Les différentes constructions plasmidiques préalablement décrites dans la partie Matériel et Méthodes ont donc été introduites dans la bactérie *P.aeruginosa* OST par électroporation. La souche OST pEAiS54-sans antigène sert de contrôle pour le test de sécrétion.

Les différentes souches transformées sont mises en culture en présence d'IPTG et d'EGTA afin d'induire l'activation de la transcription des gènes du SST3, la production et la sécrétion des protéines de fusions dans le surnageant de culture. Les protéines du surnageant sont précipitées et analysées par SDS-PAGE et Western Blot. Les différentes protéines attendues ainsi que leurs poids moléculaires théoriques sont représentés sur la figure 29.

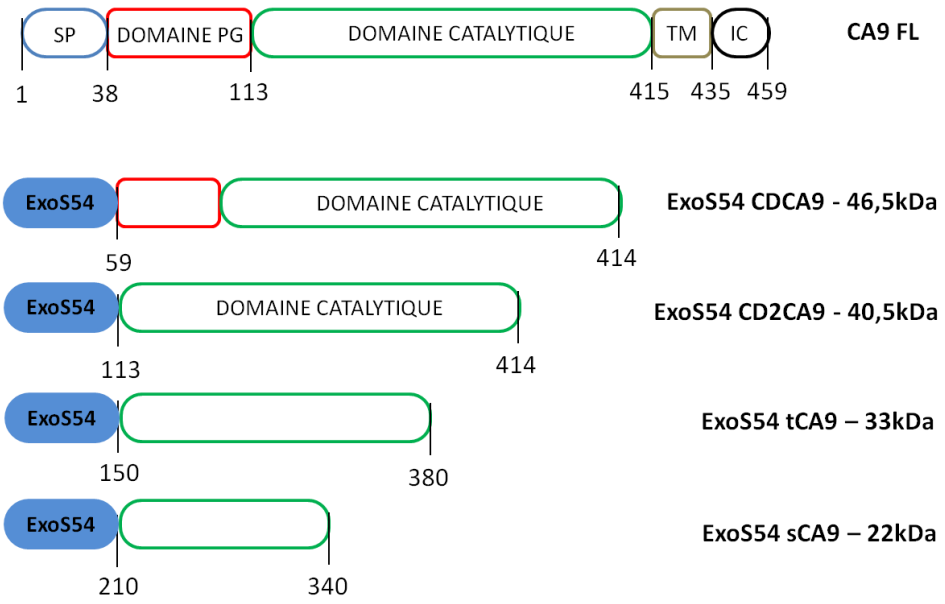


Figure 29 : Schéma de la séquence protéique de l'anhydrase carbonique 9 humaine (base de données Swiss-prot Q16790) et des protéines de fusion. CA9 FL : séquence complète (full-length) de l'anhydrase carbonique 9 **;** SP Signal peptide ; PG Protéoglycane-like ; TM :Transmembranaire ; IC : Intracellulaire

Les cultures bactériennes sont stoppées à une même densité optique (généralement DO_{600} = 1,6) afin de pouvoir comparer de manière relative la quantité de protéines produites et sécrétées entre les différentes souches. Les surnageants de culture sont traités de la même manière et un même volume de protéine est déposé sur gel d'acrylamide. Les protéines de fusion S54-CD2CA9, S54-tCA9 et S54-sCA9 sont produites et sécrétées par la bactérie via le SST3 (Figure 30a) et les poids moléculaires obtenus correspondent aux poids théoriques attendus (Figure 29). En l'absence de protéines de fusion (souche contrôle) les protéines PopB et PopD, intervenant dans la formation du pore au niveau de la cellule cible, sont retrouvées majoritairement dans le surnageant de culture. En présence d'une protéine de fusion, il semble que la sécrétion de ces 2 protéines soit moins importante et il est probable qu'une compétition ait lieu entre les différentes protéines sécrétées. Ceci est d'autant plus prononcé que la protéine de fusion est bien sécrétée (S54-sCA9).

La taille de la protéine est un paramètre qui va jouer sur sa sécrétion ; on obtient une quantité de protéine sécrétée élevée pour la forme S54-sCA9 (comparable à celle obtenue avec S54-OVA), qui décroit pour les formes plus longues. D'ailleurs, la protéine S54-CDCA9 ne semble pas être sécrétée.

Cependant cette règle ne s'applique pas à toutes les protéines car une bactérie *P. aeruginosa* sauvage est capable de sécréter des toxines de taille bien supérieure à la protéine de fusion S54-CDCA9 (les exotoxines ExoS, ExoT et ExoY ont un poids moléculaire de 48kD et ExoU

de 74kD (Galle et al., 2012a)) ; Polack *et al.* ont également montré que la protéine de fusion ExoS (AA 1-129)-p67^{phox} (environ 85kDa) était sécrétée par le SST3 (Polack et al., 2000).

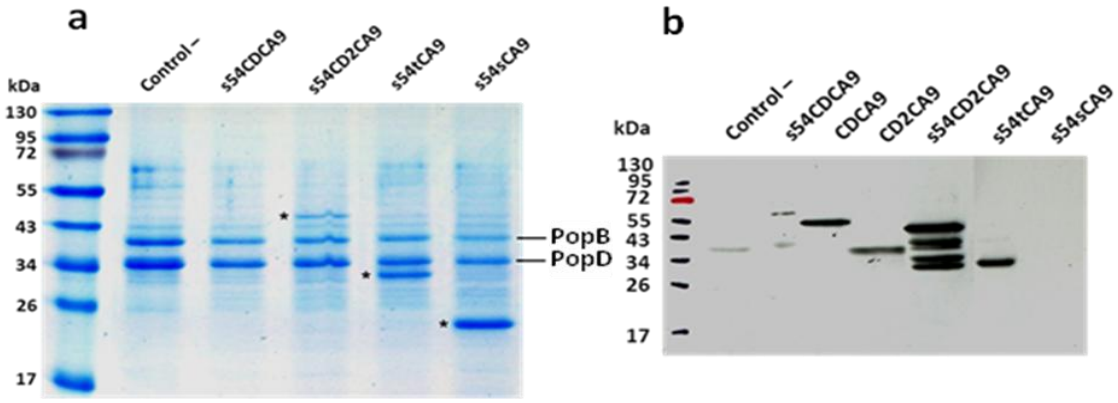


Figure 30 : Etude de la sécrétion de protéines de fusion ExoS54-fragment de l'AC9 humaine par le SST3 dans les surnageants de culture bactérienne. (a) Analyse des surnageants par SDS-PAGE et révélation au Bleu de Coomassie. ***** : protéine de fusion sécrétée **(b)** Analyse des surnageants par Western-Blot anti-AC9 humaine (anticorps monoclonal MAB2188, R&D system)

En Western-blot, on détecte les protéines S54-CD2CA9 et S54-tCA9 et très faiblement la protéine S54-CDCA9. Les protéines recombinantes CDCA9 et CD2CA9 non couplées à ExoS54 sont utilisées comme contrôles et ont été produites en système bactérien *E.coli.*

La protéine S54-sCA9 n'est par contre pas reconnue très probablement en raison de l'utilisation d'un anticorps primaire anti-hAC9 monoclonal, dont l'épitope n'est pas présent dans le fragment sCA9.

Trois bactéries « candidates », capables de produire et de sécréter en quantité raisonnable différents fragments de l'AC9, sont disponibles pour la suite de ce travail : OST S54CD2CA9, OST S54tCA9 et OST S54sCA9.

II. Mise au point d'un modèle tumoral exprimant l'anhydrase carbonique 9 humaine

Durant ce travail, nous avons cherché à élaborer deux modèles tumoraux différents capables d'exprimer l'AC9 humaine. Un premier modèle orthotopique d'adénocarcinome rénal (lignée Renca) implantable sur la souris Balb/C et un modèle hétérotopique de mélanome B16, implanté en sous-cutanée sur la souris C57BL/6.

2. Développement d'une lignée Renca hAC9

Nous souhaitions obtenir cette lignée dans le but d'avoir à disposition un modèle de carcinome rénal métastatique exprimant l'AC9 humaine de manière stable. La lignée Renca est connue pour générer des métastases pulmonaires et intrapéritonéales lorsqu'elle est implantée au niveau de la capsule rénale (Shvarts et al., 2006). L'équipe de Claude Cochet (Equipe KIN, iRTSV/BCI, CEA Grenoble), avec laquelle nous sommes en collaboration, maîtrise l'implantation chirurgicale de cellules tumorales en sous-capsulaire rénal et a développé par ailleurs des lignées tumorales de cancer du rein exprimant la luciférase, donnant accès à un suivi de la croissance tumorale et de dissémination par imagerie en luminescence. L'équipe américaine de A. Belldegrun a déjà mis au point ce modèle en effectuant une transduction de la lignée Renca par un retrovirus contenant la séquence de l'AC9 humaine (Shvarts et al., 2006). Malheureusement, malgré toute notre bonne volonté à contacter les auteurs, nous n'avons jamais pu obtenir la lignée cellulaire.

Nous avons donc initié la transfection de la lignée Renca par une méthode d'électroporation faisant varier la quantité d'ADN afin d'affiner au mieux l'expression de l'AC9 humaine par les cellules. Il est normalement requis d'utilisé 2µg d'ADN pour effectuer l'électroporation de 1-2 $x10^6$ cellules, selon le protocole du fabricant.

Le rendement à la phase de transfection transitoire (16h post-transfection) a été évalué par cytométrie en flux par étude de l'expression de la GFP après électroporation du plasmide pmaxGFP. 85% des cellules Renca exprimaient fortement la GFP (Figure 31). Pour l'AC9, une expression transitoire de l'ordre de 20% pour une même concentration d'ADN et de 54% des cellules a été obtenue à plusieurs reprises en utilisant des quantités de plasmide pcDNA3.1 hCA9 2 fois supérieures (4µg d'ADN). La séquence de la GFP et de l'AC9 dans leurs plasmides respectifs sont sous le même promoteur CMV. Après 48h de culture, une concentration de 500µg/ml de G418 était ajoutée au milieu pour débuter la sélection des cellules ayant intégré la séquence d'intérêt dans leur génome. Systématiquement l'expression de l'hAC9 était perdue au bout de quelques jours (J6) et aucune lignée stable n'a pu être générée (Figure 31).

Plusieurs essais peu fructueux avec d'autres techniques (transduction virale, lipofection) nous ont conduit à abandonner la production de ce modèle tumorale.

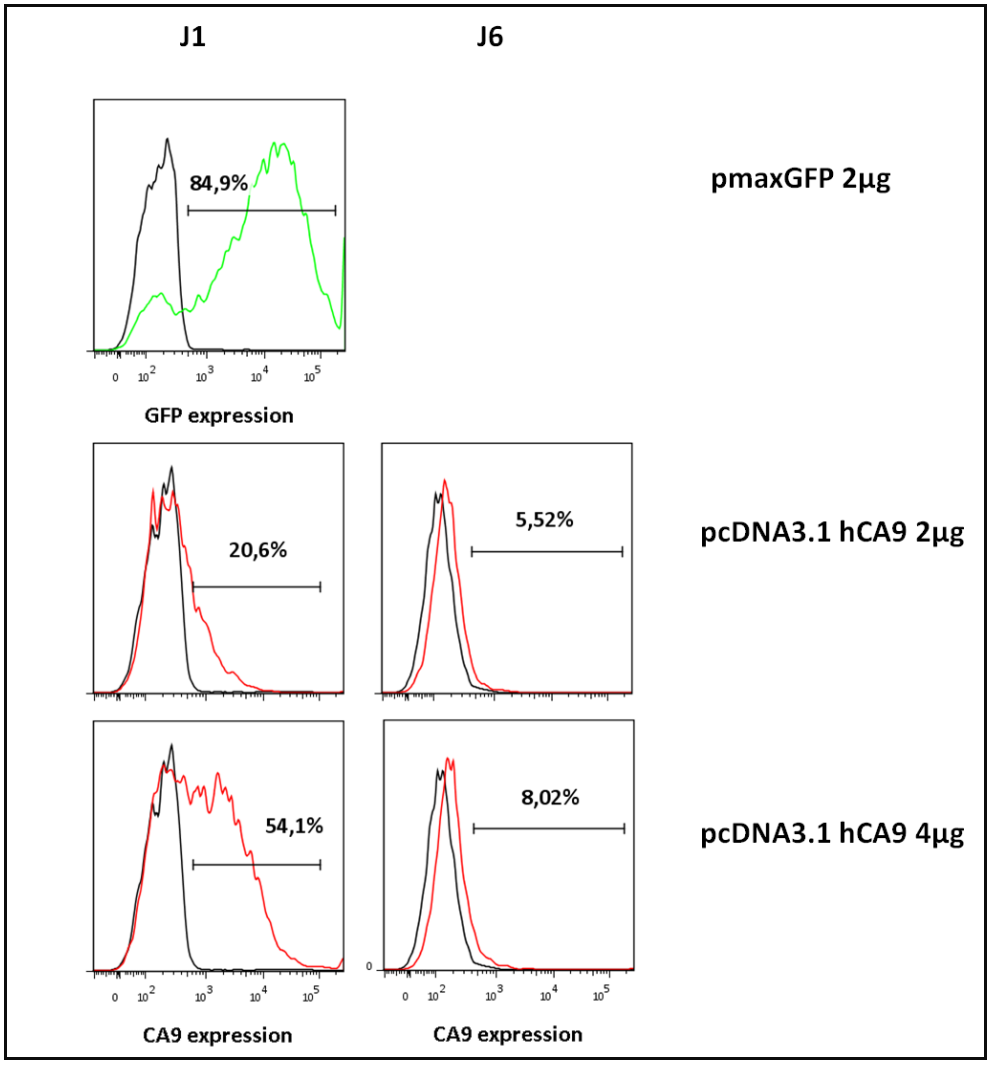


Figure 31 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'anhydrase carbonique 9 humaine suite à la transfection de la lignée Renca par le plasmide pcDNA3.1 hAC9. (J1) Expression transitoire par les cellules Renca de la GFP ou de l'AC9 humaine (histogramme vert ou rouge) électroporées avec des quantités d'ADN variables. Le pourcentage indiqué correspond au cellules positives par rapport aux cellules non transfectées (histogramme noire). **(J6)** Expression à 6 jours de l'AC9 humaine par ces mêmes cellules, pendant la phase de sélection avec G418.

3. Développement du modèle tumoral B16 hCA9

Ce modèle tumoral hétérotopique a été développé dans le but de tester l'efficacité des vecteurs bactériens « candidats » à générer une réponse immune contre l'antigène AC9, suite à l'echec de la mise au point du modèle Renca hAC9 , nécessitant un changement de souche murine par la suite.

Le protocole de transfection était identique à celui effectué sur les cellules Renca. Après 3 semaines de sélection, la grande majorité des cellules exprimaient l'hAC9. Un tri cellulaire par cytométrie en flux puis une étape de dilution limite ont permis d'établir des lignées clonales d'expression stable et d'intensité variable (Figure 32).

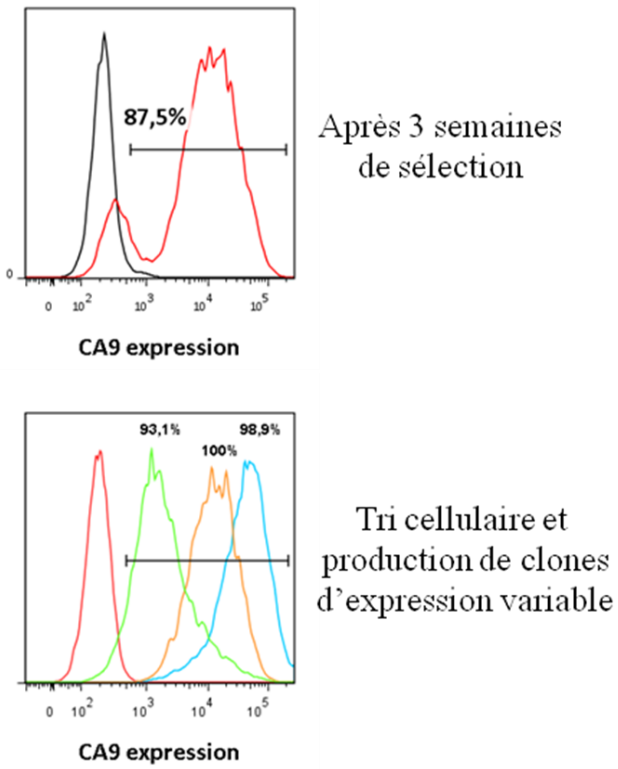


Figure 32 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'anhydrase carbonique 9 humaine par la lignée de mélanome B16. (Haut) 3 semaines après transfection et sélection par G418 500µg/ml. En rouge la lignée B16 transfectée, en noir les cellules B16 non transfectées **(Bas)** Après tri cellulaire par cytométrie en flux et sélection clonale. En noir la lignée B16 non transfectée, en couleurs, différents clones d'expression variable pour l'AC9 humaine.

Pour effectuer les expériences ultérieures de challenge tumoral, un clone exprimant fortement l'hAC9 a été choisi, et a ensuite été caractérisé par Western Blot et immunohistochimie (Figure 33).

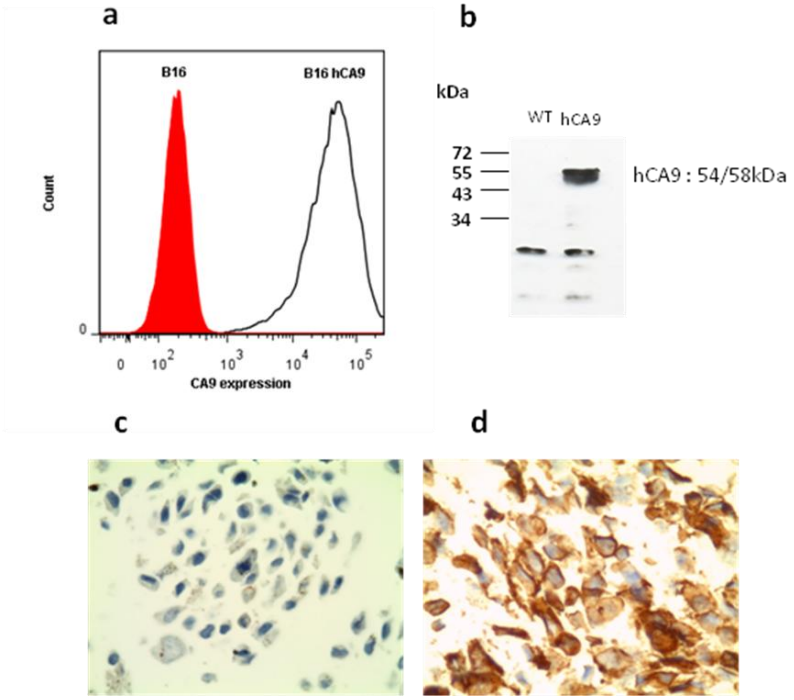


Figure 33 : Caractérisation de l'expression de l'hAC9 par la lignée clonale B16 hAC9. (a) Analyse par cytométrie en flux (Anticorps monoclonal primaire MAB2188). (b) Western-Blot anti-AC9 humain (anticorps monoclonal primaire M75). La bande inférieure non-spécifique sert de contrôle interne. (c) Confirmation par immunohistochimie de l'absence d'expression de l'hAC9 par la lignée B16 (d) et de l'expression membranaire pour la lignée transfectée (marquage en cadrants).

III. Etude de la réponse immune et évaluation de l'efficacité anti-tumorale *in vivo* en modèle murin

Les premiers essais d'immunisations et de mesure de la réponse immune générée ont été réalisés sur les souris Balb/c, pensant que le modèle cellulaire Renca hAC9 serait disponible ultérieurement. De plus des données étaient disponibles dans la littérature avec ce modèle tumoral.

Après la mise au point du modèle tumoral B16 hAC9 l'évaluation de la réponse immune et le challenge tumoral ont été initiés conjointement.

1. Etude de la réponse immune :

Sur souris Balb/c :

Différents groupes de souris ont reçu 2 injections par les souches candidates décrites ci-dessus selon le schéma décrit figure 34. L'étude de la réponse T CD8+ spécifique de l'AC9 a été effectuée par ELISpot IFNγ après prélèvement de la rate à J0 et extraction des splénocytes.

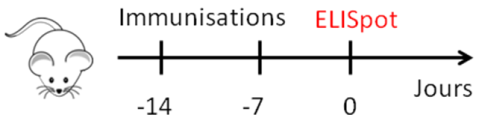


Figure 34 : Schéma d'immunisation pour la réalisation de l'ELISpot sur splénocytes de souris balb/c immunisées par différentes souches candidates

Les splénocytes ont été restimulés par les peptides épitopes décrits EYRALQLHL, AYEQLLSRL, RYFQYEGSL mais aussi par la protéine recombinante CDCA9 (hAC9 59-414). Une condition de restimulation par PMA/ionomycine (contrôle positif) et par un peptide non spécifique (contrôle négatif) a également été réalisée.

Nous n'avons observé la formation d'aucun spot pour $4x10^5$ splénocytes restimulés dans les conditions de restimulation avec les peptides hAC9, la protéine CDCA9 et le contrôle négatif, pour toutes les souches testées. Une moyenne d'environ 300 spots pour $4x10^5$ splénocytes a été obtenu pour la condition PMA/ionomycine, ce qui nous permet de dire que cette expérience, reproduite une fois, s'est déroulée dans de bonnes conditions.

Sur souris C57BL/6 :

Les souris ont été immunisées selon le schéma figure 35 avec les 3 souches candidates et la rate prélevée à J0 pour le test ELISpot.

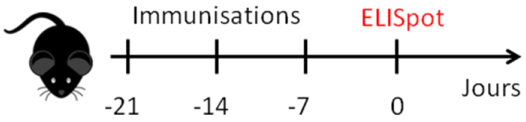


Figure 35 : Schéma d'immunisation pour la réalisation de l'ELISpot sur splénocytes de souris C57BL/6 immunisées par différentes souches candidates

Les splénocytes ont été restimulés par les peptides épitopes prédits TQPLNGRVI, WTVFNQTVM, PALRPLELL et par la protéine recombinante CDCA9 (hAC9 59-414). Une restimulation par PMA/ionomycine (contrôle positif) et par un peptide non spécifique (contrôle négatif) a également été effectuée.

De la même manière que sur les souris balb/c, nous n'avons observé la formation d'aucun spot pour $4x10^5$ splénocytes restimulés dans les conditions de restimulation avec les peptides hAC9, la protéine CDCA9 et le contrôle négatif, pour toutes les souches testées. Une moyenne d'environ 215 spots pour $4x10^5$ splénocytes a été obtenu pour la condition

PMA/ionomycine. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Pour rappel, suite à 2 injections de bactéries OST S54-OVA, une moyenne de plus de 250 spots sur $4x10^5$ splénocytes (correspondants aux nombre de cellules spécifiques capables de produire de l'IFNγ après restimulation) étaient obtenus après restimulation par le peptide immunodominant SIINFEKL ($OVA_{257-264}$) (Le Gouëllec et al., 2013).

2. Challenge tumoral en modèle de mélanome B16 hAC9 :

Un premier essai de challenge tumoral en schéma prophylactique avec le modèle B16hAC9 implanté en sous-cutanée (flanc droit) a été envisagé selon le schéma d'injection présenté figure 36. Les souris ont reçu 3 immunisations ou une injection contrôle « véhicule seul » (PBS) à 7 jours d'intervalle et les cellules tumorales ont été implantées 7 jours plus tard. La croissance tumorale était suivie tous les 2 jours et les souris étaient sorties de l'étude lorsque la taille tumorale atteignait 150mm² (largeur x longueur) ; les souris étaient alors considérées comme mortes pour l'étude de survie.

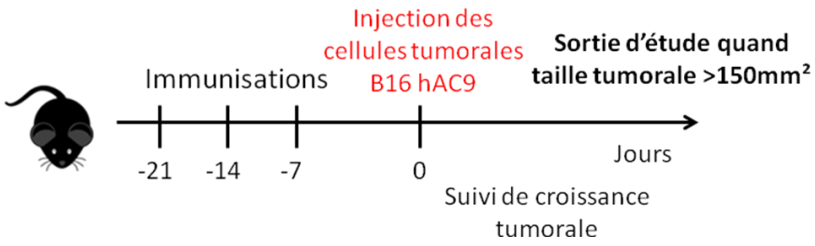


Figure 36 : Challenge tumoral n°1 en schéma d'immunisation prophylactique

Nous n'avons pas observé de différences de survie statistiquement significatives entre les groupes contrôles (PBS ou OST S54-Ei) et les groupes traitées par les différentes souches vaccinales mises au point lors de ce premier challenge tumoral (Figure 37).

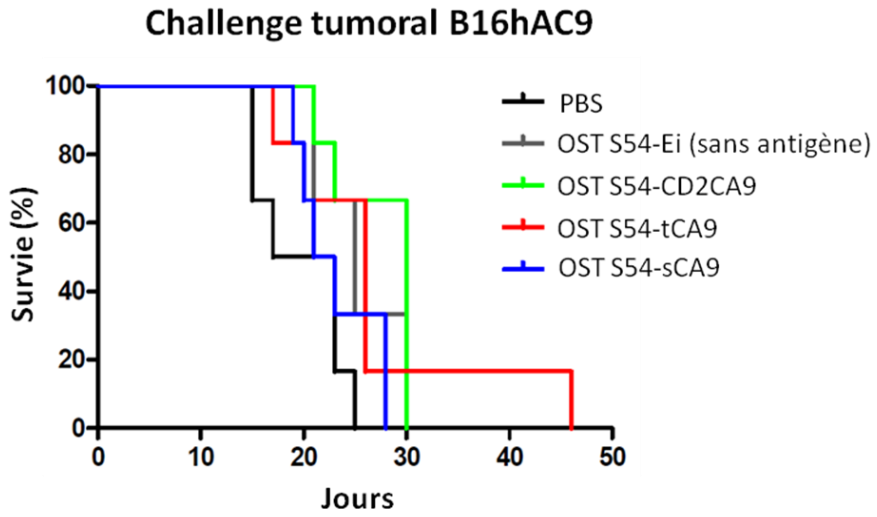


Figure 37 : Etude de survie après challenge tumoral avec le modèle de mélanome murin B16 hAC9. N=6 souris par groupe. Une étude statistique pour évaluer la différence de survie entre les groupes a été effectuée avec le test log-rank. Aucune différence n'a été observée (différence statistique quand *P*<0,05).

Un léger retard de prise tumorale a été observé pour le groupe immunisé par la souche OST-CD2CA9, raison pour laquelle nous avons initié un nouveau challenge tumoral uniquement avec cette souche en réduisant le nombre d'immunisations à 2 (schéma utilisé classiquement au laboratoire pour le modèle OVA) (Figure 38).

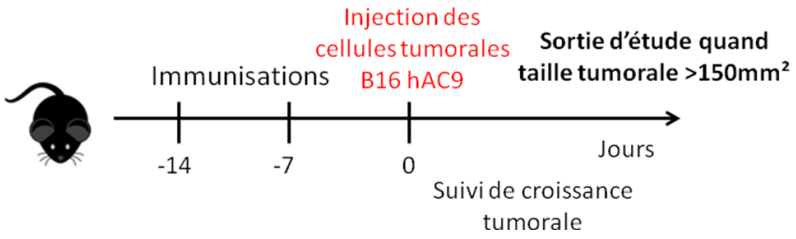


Figure 38 : Challenge tumoral n°2 en schéma d'immunisation prophylactique

Ce second challenge tumoral a donné des résultats similaires avec la souche OST S54-CD2CA9 et aucune différence de survie statistiquement significative n'a été observée entre les groupe PBS et OST S54-CD2CA9 (Figure 39).

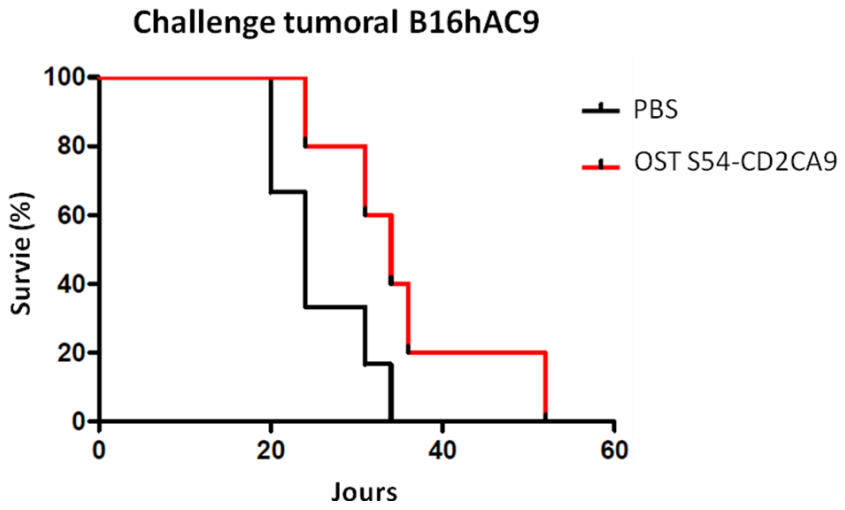


Figure 39 : Etude de survie après challenge tumoral n°2 avec le modèle de mélanome murin B16 hAC9. N=6 souris par groupe. Une étude statistique pour évaluer la différence de survie entre les 2 groupes a été effectuée avec le test log-rank. Aucune différence n'a été observée (différence statistique quand $P<0,05$).

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont été initiés sur la base des données générées par le laboratoire TheREx depuis presque 15 ans sur l'étude du SST3 de *Pseudomonas aeruginosa* en tant qu'outil de délivrance de protéines d'intérêt thérapeutique. Une des applications envisagées est l'immunothérapie anti-tumorale. La preuve de concept a été réalisée à l'aide d'une souche atténué de *P. aeruginosa* capable de délivrer *in vitro* et *in vivo* divers antigènes par son SST3, d'induire une présentation de ces antigènes par le CMH-I, et de générer une réponse T CD8+ spécifique.

Par la suite, le développement et l'optimisation du vecteur ont été poursuivis selon quatre grands axes :

1) L'amélioration de l'atténuation de la bactérie par l'obtention d'un mutant plus sûr, en veillant à ne pas modifier l'efficacité vaccinale
2) L'augmentation de son efficacité en modèle thérapeutique par la mise au point d'un nouveau schéma vaccinal
3) La production d'une souche bactérienne caractérisée pour une utilisation en phase clinique (CLIN1)
4) L'application à des antigènes de tumeurs natifs

Nous avons donc choisi d'opérer de la manière suivante :

- Explorer une nouvelle voie d'atténuation du vecteur bactérien nécessitant l'élaboration d'un nouveau mutant et la mise en oeuvre d'un traitement photochimique. Pour caractériser cette nouvelle souche, nous avons choisi de conserver le modèle B16 exprimant le xéno-antigène OVA et de l'étudier en terme de génération d'une réponse immune *in vitro* et *in vivo* et d'efficacité anti-tumorale *in vivo.*
- Approfondir la caractérisation de la réponse immune obtenue avec les différentes souches vaccinales disponibles, en particulier étudier l'infiltrat lymphocytaire de la tumeur et la capacité de protection à long terme (réponse mémoire).
- Appliquer et transposer ces acquis avec l'antigène tumoral natif humain anhydrase carbonique 9 en développant les souches candidates et en élaborant un nouveau modèle tumoral exprimant l'antigène.

A. Elaboration d'une souche *Killed But Metabolically Active*

Bien que plusieurs gènes impliqués dans la virulence de *P. aeruginosa* aient déjà été invalidés pour en faire une souche à faible risque d'utilisation (peu de dissémination ou de risque

infectieux), une approche plus sûre serait d'utiliser des bactéries inactivées. Nous nous sommes intéressés à une nouvelle méthode d'inactivation de la réplication bactérienne par un traitement photochimique dont l'utilisation était restreinte au traitement de produits sanguins. Les travaux de Brockstedt *et al.* ont pu démontré qu'en affinant ce traitement sur des mutants bactériens (*L.monocytogenes* entre autres), il était possible d'obtenir des bactéries tuées, car incapables de se répliquer, mais toujours actives métaboliquement (KBMA) (Brockstedt et al., 2005). Ils ont pu ainsi mettre au point un vecteur bactérien *Listeria* KBMA capable de délivrer un antigène et d'induire une réponse spécifique *in vitro* et *in vivo* en modèle murin puis par la suite en modèle humain *in vitro* (Skoberne et al., 2008).

Nous avons pu élaborer avec succès ce procédé inventif sur la bactérie *P. aeruginosa*. La cytotoxicité de la souche a été diminuée par rapport à une souche vivante atténuée et la réaction inflammatoire systémique était moins importante suite à immunisation. Cependant la bactérie KBMA était tout à fait capable d'amener à maturation les cellules dendritiques *in vitro* et d'induire la production de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène *in vivo*.

En revanche, il faut préciser que pour obtenir la même efficacité anti-tumorale qu'une souche vivante atténuée, une dose 40 fois supérieure de bactéries KBMA a du être injectée. Dans les travaux antérieurs de Skoberne *et al.* (Skoberne et al., 2008) une dose 100 fois supérieure de *Listeria* KBMA devait être également administrée chez la souris pour obtenir la même efficacité thérapeutique anti-tumorale que la souche vivante atténuée.

La dissémination du vecteur bactérien dans l'organisme semble être un élément majeur à la génération d'une forte réponse immune et l'obtention d'une efficacité anti-tumorale. C'est pourquoi nous avons pensé à répartir les injections de bactéries KBMA en 4 sites distincts pour « reproduire » une dissémination de manière artificielle. Néanmoins, nous n'avons pas observé une réponse systémique aussi intense que la souche atténuée et ce schéma d'injection était particulièrement lourd à gérer et paraît difficilement applicable dans de futurs essais cliniques. Dans les travaux de Brockstedt *et al.* et Skoberne *et al.,* les bactéries étaient systématiquement injectées par voie intraveineuse, assurant ainsi une dissémination plus aisée aux bactéries KBMA (Brockstedt et al., 2005; Skoberne et al., 2008) et une réponse systémique assurée. Il serait donc intéressant de tester ce type de voie d'abord avec les vecteurs *P. aeruginosa* atténués et KBMA à l'avenir. De plus deux études ont démontré que la bactérie *Listeria* s'accumulait au site tumoral après une injection intraveineuse chez la souris et persistait plusieurs jours (Kim et al., 2009; Yu et al., 2004). Cette persistance pourrait avoir

un effet antitumoral direct (Rothman and Paterson, 2013). Bien que la bactérie *P. aeruginosa* soit une bactérie aérobie stricte (*L. monocytogenes* est un pathogène aéro-anaérobie facultatif), donc avec un tropisme certainement limité pour une tumeur hypoxique, il serait également intéressant d'étudier l'effet direct de la bactérie au niveau du site tumoral.

La stratégie qui est actuellement adoptée pour plusieurs essais cliniques avec le vecteur *Listeria* est d'effectuer une antibiothérapie par amoxicilline 3 à 5 jours après l'injection du vecteur vivant atténué. On s'assure ainsi à la fois de l'efficacité du traitement, en laissant libre cour à la dissémination bactérienne, puisqu'il a été démontré qu'il suffisait de 2h d'infection par la bactérie pour induire une réponse T CD8+ spécifique *in vivo* et de 24h pour obtenir une réponse mémoire (Corbin and Harty, 2004; Starks et al., 2004), et de la sécurité du patient avec l'antibiothérapie. Ces délais ne sont pas connus par notre équipe pour la bactérie *P. aeruginosa*, mais ces observations sont un argument fort en faveur du développement clinique de vecteurs KBMA, qui serait suffisant pour induire une réponse immune et qui limiteraient l'usage des antibiotiques en post-traitement.
Pour conclure ce travail, le développement de ce traitement photochimique sur *P. aeruginosa* en vue d'une utilisation en immunothérapie a été protégé par un dépôt de brevet international (WO2013/087667).
Entre autres applications envisageables pour l'approche KBMA, le laboratoire pense tester le développement d'un vaccin prophylactique anti-*Pseudomonas*. Malgré quarante ans de recherche sur ce sujet, aucun vaccin n'est actuellement commercialisé (Döring and Pier, 2008). Le fait de conserver l'expression des facteurs de virulence et l'expression du pouvoir pathogène de la bactérie tout en bloquant sa réplication peut être une nouvelle approche vaccinale, sachant que de nombreux vaccins protéiques ou à partir de bactéries inactivées ont échoué à induire une immunité protectrice.

B. Caractérisation de l'infiltrat tumoral et de la réponse à long terme chez la souris, après immunisation avec les vecteurs *P. aeruginosa*

Etude de l'infiltrat tumoral

Le laboratoire avait préalablement démontré qu'une réponse T CD8+ spécifique du peptide SIINFEKL (peptide immunodominant $OVA_{257-264}$) était obtenue après vaccination et que la génération de cette population était dépendante de la translocation de l'antigène OVA par le

SST3 de la bactérie (Epaulard et al., 2006b). Par la suite, deux schémas de challenge tumoraux avaient été testés : un schéma d'immunisation prophylactique et un schéma dit « thérapeutique ». Le premier consistait à immuniser les souris à J-14 et J-7 puis à implanter les cellules tumorales B16-OVA à J0 ; la protection contre le développement tumoral était alors presque complète (entre 90 et 100% des souris ne développaient pas de tumeur). Pour le second, la tumeur était implantée à J0 et deux schéma d'injections étaient évalués : J0/J7 ou J7/J14. Dans le premier cas la survie des souris restait significativement meilleure que celle des contrôles, alors que dans le second la survie était identique au groupe contrôle (Epaulard et al., 2008). Cependant, il est très compliqué de mettre au point un modèle thérapeutique avec ce type de tumeur, dont la croissance tumorale est extrêmement rapide. D'autant plus que le temps d'initiation et de prolifération de la réponse des lymphocytes T spécifiques suite à l'immunisation est évalué à 7 jours environ. Habituellement, après injection sous-cutanée de 2 $x10^5$ cellules tumorales, la tumeur devient palpable en 6-7 jours et sa croissance est presque exponentielle à partir de ce moment.

Les travaux de Yan Wang ont notamment consisté à optimiser ce schéma thérapeutique en modifiant le début, le nombre et la fréquence des immunisations en modèle B16-OVA (Wang et al., 2012). Elle a pu démontrer qu'en initiant les immunisations 1 jour après avoir implanté les cellules tumorales et en les répétant tous les 4 jours, jusqu'à 6 fois, elle pouvait protéger environ 30% des souris d'un développement de la tumeur. Cette efficacité était corrélée à une forte réponse immune des CTL spécifiques (démontré par ELISpot IFNγ et restimulation par le peptide SIINFEKL). Ce schéma peut être considéré comme curatif bien qu'il soit souvent critiqué en raison du début des injections le lendemain de l'implantation de la tumeur. Mais une fois encore, il existe un délai de plusieurs jours avant que l'immunisation avec les vecteurs *P. aeruginosa* se traduise par une réponse efficace.

Dans ce travail de thèse, nous avons mis au point un nouveau schéma de vaccination thérapeutique dans l'objectif de pouvoir étudier l'infiltrat tumoral. Les cellules tumorales étaient injectées à J0 et nous débutions les immunisations avec différentes souches vaccinales dès que les tumeurs étaient palpables (environ 1 à 2 mm de diamètre), c'est-à-dire à jour 6 environ. Les immunisations étaient effectuées tous les 3 jours et les souris étaient injectées jusqu'à 6 fois. Au bout de 3 semaines, des différences significatives étaient observées entre le groupe contrôle (bactérie sans antigène) et les souris immunisées avec les vecteurs KBMA ou vivants atténués. Nous avons alors pu caractériser le phénotype des lymphocytes infiltrant la tumeur, ainsi que leur fonctionnalité par cytométrie en flux. Dans les groupes traités, une forte

proportion de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène a été détectée, démontrant la capacité des 2 vecteurs à induire une prolifération massive de cellules T spécifiques de l'antigène. Cependant, la fonctionnalité de ces cellules, évaluée par la production d'IFNγ et de TNFα suite à la restimulation de la suspension tumorale par le peptide SIINFEKL, était relativement faible. Nous avons 2 hypothèses à proposer suite à cette observation :

1) Soit d'un point de vue technique, il est très difficile d'effectuer une restimulation des lymphocytes T CD8+ spécifiques par simple ajout du peptide immunodominant dans la suspension tumorale (comme nous le faisons sur les splénocytes ou les cellules ganglionnaires) en raison d'une absence ou d'une défaillance de présentation du peptide par le CMH I. Certaines publications décrivent l'utilisation de cellules dendritiques chargées avec le peptide pour restimuler les lymphocytes présents dans une suspension tumorale (Zippelius et al., 2004). Il est par contre beaucoup plus décrit de restimuler l'ensemble de la suspension tumorale de manière non spécifique avec Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et ionomycine et de comparer la proportion de lymphocytes T produisant de l'IFNγ entre les groupes traités et les groupes contrôles.
2) Soit l'environnement tumoral induit une tolérance importante des lymphocytes T CD8+ qui sont incapables de répondre *in vitro* à une stimulation par l'épitope dont ils sont spécifiques. Notamment les travaux de Zippelius *et al.* ont montré que chez des patients atteints de mélanome, le sang et la tumeur contenaient des lymphocytes T CD8+ anti-MelanA/MART1. Cependant, parmi ce pool de lymphocytes spécifiques seuls 2 à 8% des lymphocytes intratumoraux produisaient de l'IFNγ suite à la présentation du peptide issu de MelanA/MART1 par des CD, alors que cette proportion était proche de 50% pour les lymphocytes sanguins (Zippelius et al., 2004).

Nous n'avons pas observé de modifications de la proportion des lymphocytes T_{REG} (données non présentées) dans la tumeur, qui représentait en moyenne entre 15 et 20% des lymphocytes T CD4+ présents. Par contre une augmentation du ratio LT CD8+/T_{REG} a été notée dans les groupes traités, symbolisant une réponse en faveur des lymphocytes T effecteurs plutôt que des lymphocytes T suppresseurs.

Etude de la réponse mémoire CD8+ spécifique

D'une manière générale, l'objectif de la vaccination est d'obtenir une protection contre un pathogène ou une tumeur à long terme et être ainsi capable de générer une mémoire

immunitaire vis-à-vis de l'antigène. Suite à l'initiation d'une réponse cellulaire, une petite fraction (environ 5%) des lymphocytes T CD8+ effecteurs vont évoluer en lymphocytes T CD8+ mémoires (remarquables par leur expression du récepteur à l'IL-7). Dans le cas précis de l'immunothérapie anti-tumorale, ces lymphocytes T mémoires pourront être remobilisés en cas de rechute. Deux phénotypes majeurs de lymphocytes T CD8+ mémoires T_{EM} et T_{CM}, avec des propriétés distinctes, ont été largement décrits dans la littérature (*cf.* Introduction). Une controverse anime la communauté des immunologistes à propos de la capacité de ces sous-types cellulaires à conférer une protection lors d'un rappel infectieux ou tumoral. Dans notre cas, la question de savoir laquelle de ces 2 populations, si ce n'est pas les deux, doit être obtenue en réponse à l'antigène pour le développement d'une immunothérapie efficace à long terme.

Nous avons pu démontrer que les vecteurs *P. aeruginosa* étaient capables d'induire une protection efficace à long terme lors d'un challenge tumoral, liée à la présence d'un pool majoritaire de lymphocytes T CD8+ spécifiques effecteurs mémoires ($CD62L^{low}$, $CD127^{hi}$, $KLRG1^{int}$) polyfonctionnels (production d'IFNγ, TNFα, IL-2 et dégranulation).

Nous allons à l'encontre de ce qui a été décrit, c'est-à-dire qu'un phénotype centrale mémoire majoritaire engendrait une meilleure protection qu'un phénotype effecteur mémoire, en raison de la forte capacité de prolifération et de différentiation en T_{EM} ou T_{EFF} des lymphocytes T CD8+ mémoire centrale (Klebanoff et al., 2006). Une étude de Stark *et al.* avait d'ailleurs démontré qu'un vecteur *Salmonella*-OVA, induisant une réponse mémoire effectrice était moins apte à protéger les souris d'un challenge tumoral B16-OVA, qu'un vecteur *Listeria*-OVA, induisant une réponse mémoire centrale (Stark et al., 2009).

Cependant une récente étude de Olson *et al.* a démontré qu'un sous-type de lymphocytes T CD8+ mémoires effecteurs ($CD127^{int}$ $CD62\text{-}L^{low}$ $KLRG\text{-}1^{hi}$), dont les capacités de prolifération étaient faibles, induisait une protection élevée lors d'une seconde infection systémique à *Listeria* ou au virus de la vaccine (Olson et al., 2013). Ainsi le paradigme T_{CM}/ T_{EM} semble être plus complexe, en raison de l'existence de sous-types de cellules T CD8+ mémoires, capables d'induire une protection, et qui pourrait dépendre du type de pathogènes ou de tumeurs concernés (Williams, 2013).

Enfin, nous avons observé qu'une plus forte proportion de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène était présente lors de la phase mémoire chez les souris immunisées par les bactéries vivantes atténuées (versus KBMA). Ceci pourrait s'expliquer par la persistance de la bactérie dans l'organisme (notamment au niveau des organes lymphoïdes secondaires) qui

entretiendrait une réponse du système immunitaire vis-à-vis de l'antigène. Il pourrait être intéressant d'effectuer des expériences afin de déterminer cette persistance *in vivo*, sur le long terme, afin d'étudier cette hypothèse.

C. Application à l'antigène de tumeur anhydrase carbonique 9 :

Jusqu'à présent l'antigène artificiel ovalbumine et le modèle tumoral B16-OVA ont permis d'évaluer et de caractériser cette nouvelle approche d'immunothérapie anti-tumorale active. L'objectif est de pouvoir maintenant transposer ces données à des antigènes natifs exprimés par des tumeurs humaines. L'anhydrase carbonique 9 est exprimée fortement par de nombreuses tumeurs solides et retrouvée que sur très peu de tissus sains, ce qui en fait une cible d'intérêt thérapeutique pour l'immunothérapie anti-tumorale. Plusieurs épitopes immunogènes ont été décrits chez l'homme et des réponses T cytotoxiques dirigées contre ces épitopes ont été obtenues (Uemura et al., 2006).

Nous avons donc mis au point et évalué dans un premier temps l'immunogénicité de vecteurs *P. aeruginosa* vivants (souche OST), capables de délivrer différents fragments protéiques de l'AC9 humaine *in vivo*, sur 2 souches murines différentes (C57BL/6 contexte H2b et Balb/c contexte H2d). Aucune réponse des lymphocytes T CD8+ n'a pu être détectée sur ces 2 en ELISpot IFNγ après restimulation de splénocytes de souris immunisées avec des peptides épitopes immunogènes décrits ou prédits, mais également avec la protéine AC9 humaine complète.

Un modèle tumoral B16 exprimant l'AC9 humaine a pu être développé dans l'objectif d'effectuer un challenge tumoral sur souris C57BL/6 après immunisation par les vecteurs bactériens. Nous n'avons pas pu mettre en avant de différences statistiques dans la survie des souris entre les groupes traités et les groupes contrôles.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet échec :

1) Bien qu'il s'agisse d'un antigène humain injecté chez la souris (xénoantigène), dont l'immunogénicité pouvait alors être accrue, il existe une homologie de 70% entre l'anhydrase carbonique 9 humaine (Q16790, UniprotKB) et l'anhydrase carbonique 9 murine (Q8VHB5, UniprotKB), dont les épitopes décrits ou prédits sont pour la plupart également présents dans la séquence murine. Il est donc probable que l'immunisation n'ait pas été en mesure de rompre la tolérance existante vis-à-vis de l'antigène. Néanmoins plusieurs publications utilisant d'autres approches démontrent l'obtention d'une réponse immune dirigée contre l'épitope AYEQLLSRL et une

réponse anti-tumorale (modèle Renca AC9 humaine) chez la souris Balb/c (Kim et al., 2007b; Shimizu et al., 2003).

2) Nous n'avons pas pu tester l'efficacité anti-tumorale de notre approche sur souris Balb/c, en raison de notre échec à produire ou à nous procurer le modèle de carcinome murin Renca hAC9. Les seuls essais de challenge tumoraux ont été effectué sur souris C57BL/6 avec un nouveau modèle B16-AC9h, pour lequel aucune donnée n'a été publiée. Tous les travaux décrits ont été pour l'instant effectués avec le modèle Renca hAC9 en souris Balb/c.
3) D'un point de vue technique, nous n'avons peut être pas été en mesure de détecter une réponse CD8+ dirigée contre les épitopes testés par ELISpot. Il serait intéressant de regarder si une réponse anticorps contre l'AC9 a été générée. Les sérums des souris immunisés ont été conservés pour explorer éventuellement cette piste. La présence d'anticorps pourrait nous informer sur la génération d'une potentielle réponse CD4+ contre l'AC9.

D. Perspectives

Avec le recul, le choix de l'antigène est d'une importance majeur dans ce type d'approche. En effet il est beaucoup plus complexe d'induire une immunité contre des antigènes associés aux tumeurs que des antigènes spécifiques de tumeurs, en raison de la tolérance du système immunitaire. Quelques résultats encourageants avaient pourtant été obtenus précédemment avec les antigènes associés aux mélanomes gp100 et Trp2 (Wang et al., 2012), bien qu'aucune réponse immune dirigée contre ces antigènes n'ait été clairement décrite (autrement qu'une efficacité contre la prise tumorale).
Il paraît peut être plus approprié, dans un premier temps, de cibler des antigènes spécifiques de tumeur, en particulier les oncoprotéines virales responsables de tumeurs viro-induites. Un modèle de tumeur induite par le papillomavirus, TC-1, exprimant les protéines E6 et E7 de HPV16 est utilisé pour évaluer l'efficacité d'une immunisation contre ces antigènes (Berraondo et al., 2007; Préville et al., 2005).

Certaines améliorations du vecteur sont encore à développer notamment l'intégration chromosomique d'une partie du plasmide pEAiS54-antigène. Dans un premier temps, les étapes de criblage pour choisir une bactérie candidate peuvent être faite en utilisant la construction plasmidique décrite. Mais à termes, il serait préférable de pouvoir proposer une

souche vaccinale qui ne présente pas de résistance aux antibiotiques (dans notre cas aux *β*-lactamines) et dont l'expression de l'antigène est stable. Un des risques d'utiliser une construction plasmidique est l'échange de matériel génétique qui peut se produire entre différentes éspèces bactériennes et ainsi introduire des résistances aux antibiotiques sur des bactéries initialement sensibles.

Par ailleurs une question nous est très fréquemment posée : qu'en est t'il de la réponse CD4+ ? Suite à l'immunisation il y a probablement 2 types de réponse immune adaptative auxquels nous pouvons nous attendre : une réponse dirigée contre le vecteur bactérien et une réponse dirigée contre l'antigène.
Nous avons démarré quelques expériences préliminaires pour explorer la réponse CD4+ spécifiques de l'antigène OVA suite à immunisations avec les vecteurs KBMA ou vivant atténué, afin de déterminer le type de réponse T helper obtenue. Un essai de restimulation avec le peptide immunodominant CMH II $OVA_{323-339}$ sur splénocytes de souris vaccinées, suivi d'une analyse des cytokines produites par les lymphocytes T CD4+ a été effectué. Cette expérience ne nous a pas permis d'observer une production nette d'une cytokine en particulier (parmi IL-10, IL-4, IFNγ et IL-17).
Une manière indirecte d'aborder le problème serait d'investiguer la réponse anticorps dirigée contre l'antigène OVA, qui est nécessairement liée à une « aide » des lymphocytes T CD4+ helper. En effet les lymphocytes B prolifèrent et se différencient en plasmocytes sous l'influence d'une combinaison de cytokines produites par les lymphocytes T. Ainsi l'IL-4, sécrétée par les lymphocytes T CD4+ Th2 entrainerait la production d'IgG1 ou IgE alors que l'IFNγ, produit par les lymphocytes T CD4+ Th1, favoriserait la production d'IgG2a.
En utilisant la souche OST pour vectoriser l'antigène OVA, Epaulard *et al.* avait mis en évidence un titre relativement faible d'anticorps anti-OVA circulant (1/90) (Epaulard et al., 2006c), mais ces anticorps étaient bien présents. Une expérience simple serait de déterminer le sous-type d'IgG anti-OVA par un test ELISA pour identifier le type de réponse CD4+ T helper spécifiques de l'antigène.

La start-up APCure a été créée en 2012 et bénéficie d'une licence d'exploitation exclusive mondiale des 2 brevets de TheREx, dont celui sur le traitement photochimique (KBMA), pour le développement de vaccins thérapeutiques à partir de la technologie BacVac®.

Le développement d'immunothérapies anti-tumorales actives par l'usage de vecteurs bactériens a bénéficié d'avancées majeures ces dernières années et ces approches sont promues à un bel avenir, comme en témoigne le développement de thérapies innovantes par les sociétés américaines Aduro Biotech et Advaxis en phase clinique avec comme vecteur *Listeria monocytogenes.*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aarntzen, E.H.J.G., De Vries, I.J.M., Lesterhuis, W.J., Schuurhuis, D., Jacobs, J.F.M., Bol, K., Schreibelt, G., Mus, R., De Wilt, J.H.W., Haanen, J.B.A.G., et al. (2013). Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. Cancer Res. *73*, 19–29.

Ahmed, R. (1996). Tickling memory T cells. Science *272*, 1904.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology *4*, 499–511.

Albert, M.L., and Darnell, R.B. (2004). Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. Nat. Rev. Cancer *4*, 36–44.

Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., Ruppert, J., Oseroff, C., Maewal, A., Snoke, K., Serra, H.M., Kubo, R.T., and Sette, A. (1994). Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. Immunity *1*, 751–761.

Almeida, J.R., Price, D.A., Papagno, L., Arkoub, Z.A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T.E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., et al. (2007). Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. J. Exp. Med. *204*, 2473–2485.

Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C.T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., et al. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 16233–16238.

Anderson, R.J., and Schneider, J. (2007). Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. Vaccine *25 Suppl 2*, B24–34.

Appay, V., Douek, D.C., and Price, D.A. (2008). CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. Nat. Med. *14*, 623–628.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J. Biol. Chem. *277*, 15028–15034.

B

Bachmann, M.F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. Eur. J. Immunol. *29*, 291–299.

Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., and Oxenius, A. (2005a). Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. J. Immunol. *175*, 4686–4696.

Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2005b). Recall proliferation potential of memory CD8+ T cells and antiviral protection. J. Immunol. *175*, 4677–4685.

Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat. Rev. Immunol. *5*, 296–306.

Baxevanis, C.N., Voutsas, I.F., Tsitsilonis, O.E., Gritzapis, A.D., Sotiriadou, R., and Papamichail, M. (2000). Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. J. Immunol. *164*, 3902–3912.

Berg, R.E., Crossley, E., Murray, S., and Forman, J. (2003). Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against Listeria monocytogenes in the absence of cognate antigen. J. Exp. Med. *198*, 1583–1593.

Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S.R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. J. Clin. Invest. *118*, 294–305.

Berraondo, P., Nouzé, C., Préville, X., Ladant, D., and Leclerc, C. (2007). Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. Cancer Res. *67*, 8847–8855.

Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood *107*, 4781–4789.

Bichsel, C., Neeld, D.K., Hamazaki, T., Wu, D., Chang, L.-J., Yang, L., Terada, N., and Jin, S. (2011). Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. PLoS ONE *6*, e16465.

Bichsel, C., Neeld, D., Hamazaki, T., Chang, L.-J., Yang, L.-J., Terada, N., and Jin, S. (2013). Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. Cell Reprogram *15*, 117–125.

Birkhäuser, F.D., Koya, R.C., Neufeld, C., Rampersaud, E.N., Lu, X., Micewicz, E.D., Chodon, T., Atefi, M., Kroeger, N., Chandramouli, G.V.R., et al. (2013). Dendritic cell-based immunotherapy in prevention and treatment of renal cell carcinoma: efficacy, safety, and activity of Ad-GM·CAIX in immunocompetent mouse models. J. Immunother. *36*, 102–111.

Birmingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B.E., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2008). Listeriolysin O allows Listeria monocytogenes replication in macrophage vacuoles. Nature *451*, 350–354.

Bismar, T.A., Bianco, F.J., Zhang, H., Li, X., Sarkar, F.H., Sakr, W.A., Grignon, D.J., and Che, M. (2003). Quantification of G250 mRNA expression in renal epithelial neoplasms by real-time reverse transcription-PCR of dissected tissue from paraffin sections. Pathology *35*, 513–517.

Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J.D., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. J. Exp. Med. *195*, 657–664.

Bleumer, I., Knuth, A., Oosterwijk, E., Hofmann, R., Varga, Z., Lamers, C., Kruit, W., Melchior, S., Mala, C., Ullrich, S., et al. (2004). A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. Br. J. Cancer *90*, 985–990.

Bleumer, I., Tiemessen, D.M., Oosterwijk-Wakka, J.C., Völler, M.C.W., De Weijer, K., Mulders, P.F.A., and Oosterwijk, E. (2007a). Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. J. Immunother. *30*, 116–122.

Bleumer, I., Tiemessen, D.M., Oosterwijk-Wakka, J.C., Völler, M.C.W., De Weijer, K., Mulders, P.F.A., and Oosterwijk, E. (2007b). Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. J. Immunother. *30*, 116–122.

Bos, R., and Sherman, L.A. (2010). CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. Cancer Res. *70*, 8368–8377.

Brandau, S., and Suttmann, H. (2007). Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. Biomed. Pharmacother. *61*, 299–305.

Brockstedt, D.G., Bahjat, K.S., Giedlin, M.A., Liu, W., Leong, M., Luckett, W., Gao, Y., Schnupf, P., Kapadia, D., Castro, G., et al. (2005). Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat. Med. *11*, 853–860.

Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. Annu. Rev. Immunol. *19*, 375–396.

Brouwers, A.H., van Eerd, J.E.M., Frielink, C., Oosterwijk, E., Oyen, W.J.G., Corstens, F.H.M., and Boerman, O.C. (2004). Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with 131I, 90Y, 177Lu, or 186Re. J. Nucl. Med. *45*, 327–337.

Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science *254*, 1643–1647.

Bruno, T.F., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2000). Exoenzyme S from Pseudomonas aeruginosa induces apoptosis in T lymphocytes. J. Leukoc. Biol. *67*, 808–816.

Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A., Brady, K.M., and Yahr, T.L. (2008). Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system. Mol. Microbiol. *68*, 657–671.

Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2011). Translating tumor antigens into cancer vaccines. Clin. Vaccine Immunol. *18*, 23–34.

C

Campoli, M., Chang, C.-C., and Ferrone, S. (2002). HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. Vaccine *20 Suppl 4*, A40–45.

Cawood, R., Hills, T., Wong, S.L., Alamoudi, A.A., Beadle, S., Fisher, K.D., and Seymour, L.W. (2012). Recombinant viral vaccines for cancer. Trends Mol Med *18*, 564–574.

Cecchi, A., Hulikova, A., Pastorek, J., Pastoreková, S., Scozzafava, A., Winum, J.-Y., Montero, J.-L., and Supuran, C.T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors. J. Med. Chem. *48*, 4834–4841.

Chapuis, A.G., Thompson, J.A., Margolin, K.A., Rodmyre, R., Lai, I.P., Dowdy, K., Farrar, E.A., Bhatia, S., Sabath, D.E., Cao, J., et al. (2012). Transferred melanoma-specific CD8+ T cells persist, mediate tumor regression, and acquire central memory phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 4592–4597.

Cheever, M.A., and Higano, C.S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. Clin. Cancer Res. *17*, 3520–3526.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin. Cancer Res. *15*, 5323–5337.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat. Rev. Immunol.

Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouysségur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. Cancer Res. *69*, 358–368.

Coley, W.B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). Proc. R. Soc. Med. *3*, 1–48.

Corbin, G.A., and Harty, J.T. (2004). Duration of infection and antigen display have minimal influence on the kinetics of the CD4+ T cell response to Listeria monocytogenes infection. J. Immunol. *173*, 5679–5687.

Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science *342*, 1432–1433.

Csaderova, L., Debreova, M., Radvak, P., Stano, M., Vrestiakova, M., Kopacek, J., Pastorekova, S., and Svastova, E. (2013). The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. Front Physiol *4*, 271.

D

D'Souza, W.N., and Lefrançois, L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. J. Immunol. *171*, 5727–5735.

Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. Infect. Immun. *67*, 6164–6167.

Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000). Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. Infect. Immun. *68*, 2916–2924.

Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages. Mol. Microbiol. *40*, 76–85.

Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W.B., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., et al. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. Nat. Med. *13*, 843–850.

Davis, I.D., Wiseman, G.A., Lee, F.-T., Gansen, D.N., Hopkins, W., Papenfuss, A.T., Liu, Z., Moynihan, T.J., Croghan, G.A., Adjei, A.A., et al. (2007). A phase I multiple dose, dose escalation study of cG250 monoclonal antibody in patients with advanced renal cell carcinoma. Cancer Immun. *7*, 13.

Derouazi, M., Wang, Y., Marlu, R., Epaulard, O., Mayol, J.-F., Pasqual, N., Le Gouellec, A., Polack, B., and Toussaint, B. (2010). Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2. Bioeng Bugs *1*, 51–60.

Dhodapkar, M.V., Dhodapkar, K.M., and Palucka, A.K. (2008). Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. Cell Death Differ. *15*, 39–50.

Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. J. Exp. Med. *208*, 1989–2003.

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. Immunity *1*, 447–456.

Ditte, P., Dequiedt, F., Svastova, E., Hulikova, A., Ohradanova-Repic, A., Zatovicova, M., Csaderova, L., Kopacek, J., Supuran, C.T., Pastorekova, S., et al. (2011). Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. Cancer Res. *71*, 7558–7567.

Dorai, T., Sawczuk, I.S., Pastorek, J., Wiernik, P.H., and Dutcher, J.P. (2005). The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. Eur. J. Cancer *41*, 2935–2947.

Döring, G., and Pier, G.B. (2008). Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. Vaccine *26*, 1011–1024.

Dorner, B.G., Scheffold, A., Rolph, M.S., Huser, M.B., Kaufmann, S.H.E., Radbruch, A., Flesch, I.E.A., and Kroczek, R.A. (2002). MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 6181–6186.

Dubensky, T.W., Jr, Skoble, J., Lauer, P., and Brockstedt, D.G. (2012a). Killed but metabolically active vaccines. Curr. Opin. Biotechnol. *23*, 917–923.

Dubensky, T.W., Jr, Skoble, J., Lauer, P., and Brockstedt, D.G. (2012b). Killed but metabolically active vaccines. Curr. Opin. Biotechnol. *23*, 917–923.

E

Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., et al. (2006a). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. Mol. Ther. *14*, 656–661.

Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., et al. (2006b). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. Mol. Ther. *14*, 656–661.

Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., et al. (2006c). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. Mol. Ther. *14*, 656–661.

Epaulard, O., Derouazi, M., Margerit, C., Marlu, R., Filopon, D., Polack, B., and Toussaint, B. (2008). Optimization of a type III secretion system-based Pseudomonas aeruginosa live vector for antigen delivery. Clin. Vaccine Immunol. *15*, 308–313.

Epelman, S., Bruno, T.F., Neely, G.G., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2000). Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. Infect. Immun. *68*, 4811–4814.

Epelman, S., Neely, G.G., Ma, L.L., Gjomarkaj, M., Pace, E., Melis, M., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2002). Distinct fates of monocytes and T cells directly activated by Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S. J. Leukoc. Biol. *71*, 458–468.

Euvrard, S., Kanitakis, J., and Claudy, A. (2003). Skin cancers after organ transplantation. N. Engl. J. Med. *348*, 1681–1691.

F

Faiola, B., Doyle, C., Gilboa, E., and Nair, S. (2002). Influence of CD4 T cells and the source of major histocompatibility complex class II-restricted peptides on cytotoxic T-cell priming by dendritic cells. Immunology *105*, 47–55.

Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. Immunity *30*, 324–335.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A.R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. Microbiology (Reading, Engl.) *147*, 2659–2669.

Fensterle, J., Bergmann, B., Yone, C.L.R.P., Hotz, C., Meyer, S.R., Spreng, S., Goebel, W., Rapp, U.R., and Gentschev, I. (2008). Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. Cancer Gene Ther. *15*, 85–93.

Filopon, D., Mérieau, A., Bernot, G., Comet, J.-P., Leberre, R., Guery, B., Polack, B., and Guespin-Michel, J. (2006). Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in P. aeruginosa. BMC Bioinformatics *7*, 272.

Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., Wu, C., Mende-Mueller, L., and Frank, D.W. (1997). ExoU expression by Pseudomonas aeruginosa correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol. Microbiol. *25*, 547–557.

Finn, O.J. (2008). Cancer immunology. N. Engl. J. Med. *358*, 2704–2715.

Fioretti, D., Iurescia, S., and Rinaldi, M. (2013). Recent Advances in Design of Immunogenic and Effective Naked DNA Vaccines against Cancer. Recent Pat Anticancer Drug Discov.

Forbes, N.S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *10*, 785–794.

Frank, D.W. (1997). The exoenzyme S regulon of Pseudomonas aeruginosa. Mol. Microbiol. *26*, 621–629.

Frank, D.W., and Iglewski, B.H. (1991). Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. *173*, 6460–6468.

Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1997). Intracellular targeting of exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. Mol. Microbiol. *25*, 1125–1139.

Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. J. Exp. Med. *208*, 2005–2016.

G

Galán, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature *444*, 567–573.

Galle, M., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2012a). Structure and function of the Type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa. Curr. Protein Pept. Sci. *13*, 831–842.

Galle, M., Jin, S., Bogaert, P., Haegman, M., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (2012b). The Pseudomonas aeruginosa type III secretion system has an exotoxin S/T/Y independent pathogenic role during acute lung infection. PLoS ONE *7*, e41547.

Gieling, R.G., and Williams, K.J. (2013). Carbonic anhydrase IX as a target for metastatic disease. Bioorg. Med. Chem. *21*, 1470–1476.

Gondi, G., Mysliwietz, J., Hulikova, A., Jen, J.P., Swietach, P., Kremmer, E., and Zeidler, R. (2013). Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII. Cancer Res. *73*, 6494–6503.

Le Gouëllec, A., Chauchet, X., Polack, B., Buffat, L., and Toussaint, B. (2012). Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. Hum Vaccin Immunother *8*, 1454–1458.

Le Gouëllec, A., Chauchet, X., Laurin, D., Aspord, C., Verove, J., Wang, Y., Genestet, C., Trocme, C., Ahmadi, M., Martin, S., et al. (2013). A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. Mol. Ther. *21*, 1076–1086.

Grabmaier, K., A de Weijert, M.C., Verhaegh, G.W., Schalken, J.A., and Oosterwijk, E. (2004). Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. Oncogene *23*, 5624–5631.

Graus, F., Delattre, J.Y., Antoine, J.C., Dalmau, J., Giometto, B., Grisold, W., Honnorat, J., Smitt, P.S., Vedeler, C., Verschuuren, J.J.G.M., et al. (2004). Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. *75*, 1135–1140.

Gut, M.O., Parkkila, S., Vernerová, Z., Rohde, E., Závada, J., Höcker, M., Pastorek, J., Karttunen, T., Gibadulinová, A., Závadová, Z., et al. (2002). Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. Gastroenterology *123*, 1889–1903.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). $CD4^+$ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. J. Clin. Invest. *123*, 2873–2892.

H

Haicheur, N., Bismuth, E., Bosset, S., Adotevi, O., Warnier, G., Lacabanne, V., Regnault, A., Desaymard, C., Amigorena, S., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2000). The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. J. Immunol. *165*, 3301–3308.

Hakim, F.T., Flomerfelt, F.A., Boyiadzis, M., and Gress, R.E. (2004). Aging, immunity and cancer. Curr. Opin. Immunol. *16*, 151–156.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. Nat. Rev. Microbiol. *7*, 654–665.

Hauser, A.R., and Engel, J.N. (1999). Pseudomonas aeruginosa induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. Infect. Immun. *67*, 5530–5537.

Hegazy, W.A.H., Xu, X., Metelitsa, L., and Hensel, M. (2012). Evaluation of Salmonella enterica type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. Infect. Immun. *80*, 1193–1202.

Hernández, J.M., Bui, M.H.T., Han, K.-R., Mukouyama, H., Freitas, D.G., Nguyen, D., Caliliw, R., Shintaku, P.I., Paik, S.H., Tso, C.-L., et al. (2003). Novel kidney cancer immunotherapy based on the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and carbonic anhydrase IX fusion gene. Clin. Cancer Res. *9*, 1906–1916.

Hikono, H., Kohlmeier, J.E., Ely, K.H., Scott, I., Roberts, A.D., Blackman, M.A., and Woodland, D.L. (2006). T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. Immunol. Rev. *211*, 119–132.

Hilvo, M., Rafajová, M., Pastoreková, S., Pastorek, J., and Parkkila, S. (2004). Expression of carbonic anhydrase IX in mouse tissues. J. Histochem. Cytochem. *52*, 1313–1322.

Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A.M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S.M., Di Fiore, A., De Simone, G., et al. (2008). Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. J. Biol. Chem. *283*, 27799–27809.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. *363*, 711–723.

Van Houten, B., Croteau, D.L., DellaVecchia, M.J., Wang, H., and Kisker, C. (2005). "Close-fitting sleeves": DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. Mutat. Res. *577*, 92–117.

Hovey, A.K., and Frank, D.W. (1995). Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S regulon. J. Bacteriol. *177*, 4427–4436.

Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *62*, 379–433.

Hulikova, A., Zatovicova, M., Svastova, E., Ditte, P., Brasseur, R., Kettmann, R., Supuran, C.T., Kopacek, J., Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2009). Intact intracellular tail is critical for proper

functioning of the tumor-associated, hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX. FEBS Lett. *583*, 3563–3568.

Hunder, N.N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D.W., Reilly, J.Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjatic, S., Thompson, J.A., and Yee, C. (2008). Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. N. Engl. J. Med. *358*, 2698–2703.

I

Ivanov, S., Liao, S.Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M.J., Proescholdt, M.A., Oldfield, E.H., Lee, J., et al. (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. Am. J. Pathol. *158*, 905–919.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat. Immunol. *5*, 987–995.

J

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., and Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. Nature *421*, 852–856.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA Cancer J Clin *61*, 69–90.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. *12*, 557–569.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity *27*, 281–295.

K

Kaech, S.M., and Ahmed, R. (2003). Immunology. CD8 T cells remember with a little help. Science *300*, 263–265.

Kaech, S.M., and Wherry, E.J. (2007). Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. Immunity *27*, 393–405.

Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. Nat. Immunol. *4*, 1191–1198.

Kaluz, S., Kaluzová, M., Chrastina, A., Olive, P.L., Pastoreková, S., Pastorek, J., Lerman, M.I., and Stanbridge, E.J. (2002). Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: a role for phosphatidylinositol 3'-kinase. Cancer Res. *62*, 4469–4477.

Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S.-Y., Lerman, M., and Stanbridge, E.J. (2009). Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? Biochim. Biophys. Acta *1795*, 162–172.

Kang, P.J., Hauser, A.R., Apodaca, G., Fleiszig, S.M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., and Engel, J.N. (1997). Identification of Pseudomonas aeruginosa genes required for epithelial cell injury. Mol. Microbiol. *24*, 1249–1262.

Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N. Engl. J. Med. *363*, 411–422.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. *11*, 373–384.

Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. Immunity *23*, 249–262.

Kim, H.L., Sun, X., Subjeck, J.R., and Wang, X.-Y. (2007a). Evaluation of renal cell carcinoma vaccines targeting carbonic anhydrase IX using heat shock protein 110. Cancer Immunol. Immunother. *56*, 1097–1105.

Kim, H.L., Sun, X., Subjeck, J.R., and Wang, X.-Y. (2007b). Evaluation of renal cell carcinoma vaccines targeting carbonic anhydrase IX using heat shock protein 110. Cancer Immunol. Immunother. *56*, 1097–1105.

Kim, S.H., Castro, F., Paterson, Y., and Gravekamp, C. (2009). High efficacy of a Listeria-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action. Cancer Res. *69*, 5860–5866.

Kirkwood, J.M., Butterfield, L.H., Tarhini, A.A., Zarour, H., Kalinski, P., and Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. CA Cancer J Clin *62*, 309–335.

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A.R., Finkelstein, S.E., Palmer, D.C., Antony, P.A., Hwang, S.T., Rosenberg, S.A., et al. (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 9571–9576.

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. Immunol. Rev. *211*, 214–224.

Kotton, C.N., Lankowski, A.J., Scott, N., Sisul, D., Chen, L.M., Raschke, K., Borders, G., Boaz, M., Spentzou, A., Galán, J.E., et al. (2006). Safety and immunogenicity of attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the Salmonella Type III secretion system. Vaccine *24*, 6216–6224.

Kroemer, G., Zitvogel, L., and Galluzzi, L. (2013). Victories and deceptions in tumor immunology: Stimuvax(®). Oncoimmunology *2*, e23687.

Kupz, A., Guarda, G., Gebhardt, T., Sander, L.E., Short, K.R., Diavatopoulos, D.A., Wijburg, O.L.C., Cao, H., Waithman, J.C., Chen, W., et al. (2012). NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8+ T cells. Nature Immunology *13*, 162–169.

L

Lamers, C.H.J., Sleijfer, S., Vulto, A.G., Kruit, W.H.J., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J.W., Stoter, G., and Oosterwijk, E. (2006). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. J. Clin. Oncol. *24*, e20–22.

Lamers, C.H.J., Willemsen, R., van Elzakker, P., van Steenbergen-Langeveld, S., Broertjes, M., Oosterwijk-Wakka, J., Oosterwijk, E., Sleijfer, S., Debets, R., and Gratama, J.W. (2011). Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. Blood *117*, 72–82.

Lankowski, A.J., and Hohmann, E.L. (2007). Killed but metabolically active Salmonella typhimurium: application of a new technology to an old vector. J. Infect. Dis. *195*, 1203–1211.

Laurent, C., Fazilleau, N., and Brousset, P. (2010). A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. Haematologica *95*, 356–358.

Le Gouellec A., Polack B., Shen D. and B. Toussaint (2012). The regulation of the expression of type three secretion systems: an example from Pseudomonas aeruginosa. In Regulation of Bacterial Virulence, (Michael Vasil and Andrew Darwin),.

Ledford, H. (2014). Cancer treatment: The killer within. Nature *508*, 24–26.

Leibovich, B.C., Sheinin, Y., Lohse, C.M., Thompson, R.H., Cheville, J.C., Zavada, J., and Kwon, E.D. (2007). Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. J. Clin. Oncol. *25*, 4757–4764.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973–983.

Leppilampi, M., Karttunen, T.J., Kivelä, J., Gut, M.O., Pastoreková, S., Pastorek, J., and Parkkila, S. (2005). Gastric pit cell hyperplasia and glandular atrophy in carbonic anhydrase IX knockout mice: studies on two strains C57/BL6 and BALB/C. Transgenic Res. *14*, 655–663.

Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu. Rev. Immunol. *23*, 275–306.

Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. Immunol. Rev. *234*, 45–54.

Liu, D., Rhebergen, A.M., and Eisenbarth, S.C. (2013). Licensing Adaptive Immunity by NOD-Like Receptors. Front Immunol *4*, 486.

Lou, Y., McDonald, P.C., Oloumi, A., Chia, S., Ostlund, C., Ahmadi, A., Kyle, A., Auf dem Keller, U., Leung, S., Huntsman, D., et al. (2011). Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. Cancer Res. *71*, 3364–3376.

M

Madan, R.A., Bilusic, M., Heery, C., Schlom, J., and Gulley, J.L. (2012). Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines. Semin. Oncol. *39*, 296–304.

Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S.-A., Scozzafava, A., Quinn, R.J., and Supuran, C.T. (2009). Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors. J. Am. Chem. Soc. *131*, 3057–3062.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. Immunity *31*, 787–798.

Marx, C.J., and Lidstrom, M.E. (2002). Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. BioTechniques *33*, 1062–1067.

Marzo, A.L., Kinnear, B.F., Lake, R.A., Frelinger, J.J., Collins, E.J., Robinson, B.W., and Scott, B. (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. J. Immunol. *165*, 6047–6055.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. Science *291*, 2413–2417.

McDonald, P.C., Winum, J.-Y., Supuran, C.T., and Dedhar, S. (2012). Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. Oncotarget *3*, 84–97.

Medzhitov, R. (2001). TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. Nature Reviews Immunology *1*, 135–145.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. Nature *480*, 480–489.

Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M., and Nitti, D. (2004). Part I: Vaccines for solid tumours. Lancet Oncol. *5*, 681–689.

Morris, J.C., Chiche, J., Grellier, C., Lopez, M., Bornaghi, L.F., Maresca, A., Supuran, C.T., Pouysségur, J., and Poulsen, S.-A. (2011). Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. J. Med. Chem. *54*, 6905–6918.

Mukouyama, H., Janzen, N.K., Hernandez, J.M., Lam, J.S., Caliliw, R., Wang, A.Y., Figlin, R.A., Belldegrun, A.S., and Zeng, G. (2004). Generation of kidney cancer-specific antitumor immune responses using peripheral blood monocytes transduced with a recombinant adenovirus encoding carbonic anhydrase 9. Clin. Cancer Res. *10*, 1421–1429.

Muranski, P., and Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. Blood.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., et al. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. Blood *112*, 362–373.

Murri-Plesko, M.T., Hulikova, A., Oosterwijk, E., Scott, A.M., Zortea, A., Harris, A.L., Ritter, G., Old, L., Bauer, S., Swietach, P., et al. (2011). Antibody inhibiting enzymatic activity of tumour-associated carbonic anhydrase isoform IX. Eur. J. Pharmacol. *657*, 173–183.

N

Nishikawa, H., Sato, E., Briones, G., Chen, L.-M., Matsuo, M., Nagata, Y., Ritter, G., Jäger, E., Nomura, H., Kondo, S., et al. (2006). In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. J. Clin. Invest. *116*, 1946–1954.

Nishikawa, H., Tsuji, T., Jäger, E., Briones, G., Ritter, G., Old, L.J., Galán, J.E., Shiku, H., and Gnjatic, S. (2008). Induction of regulatory T cell-resistant helper CD4+ T cells by bacterial vector. Blood *111*, 1404–1412.

Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. Cancer Immunol. Immunother. *54*, 187–207.

Nuñez, S., Saez, J.J., Fernandez, D., Flores-Santibañez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V., et al. (2013). T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. Immunology *139*, 61–71.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. Immunity *29*, 138–149.

O

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science *327*, 1098–1102.

Olson, J.A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S.C., and Hamilton, S.E. (2013). Effector-like $CD8^+$ T cells in the memory population mediate potent protective immunity. Immunity *38*, 1250–1260.

Oosterwijk, E., Ruiter, D.J., Hoedemaeker, P.J., Pauwels, E.K., Jonas, U., Zwartendijk, J., and Warnaar, S.O. (1986). Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. Int. J. Cancer *38*, 489–494.

Oosterwijk-Wakka, J.C., Boerman, O.C., Mulders, P.F.A., and Oosterwijk, E. (2013). Application of Monoclonal Antibody G250 Recognizing Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma. Int J Mol Sci *14*, 11402–11423.

Opavský, R., Pastoreková, S., Zelník, V., Gibadulinová, A., Stanbridge, E.J., Závada, J., Kettmann, R., and Pastorek, J. (1996). Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. Genomics *33*, 480–487.

P

Pacchiano, F., Carta, F., McDonald, P.C., Lou, Y., Vullo, D., Scozzafava, A., Dedhar, S., and Supuran, C.T. (2011). Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. J. Med. Chem. *54*, 1896–1902.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. Nat. Rev. Cancer *12*, 265–277.

Pan, P., Parkkila, A.-K., Autio, S., Hilvo, M., Sormunen, R., Pastorekova, S., Pastorek, J., Haapasalo, H., and Parkkila, S. (2012). Brain phenotype of carbonic anhydrase IX-deficient mice. Transgenic Res. *21*, 163–176.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer *12*, 252–264.

Parkkila, S., Rajaniemi, H., Parkkila, A.K., Kivela, J., Waheed, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., and Sly, W.S. (2000). Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 2220–2224.

Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. J. Cell. Physiol. *226*, 299–308.

Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., and Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. J. Immunol. *178*, 1975–1979.

Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., Mornon, J.P., Zelník, V., Opavský, R., Zat'ovicová, M., Liao, S., Portetelle, D., and Stanbridge, E.J. (1994). Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. Oncogene *9*, 2877–2888.

Pastorekova, S., Zatovicova, M., and Pastorek, J. (2008). Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. Curr. Pharm. Des. *14*, 685–698.

Pastoreková, S., Závadová, Z., Kostál, M., Babusíková, O., and Závada, J. (1992). A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. Virology *187*, 620–626.

Paterson, Y., Guirnalda, P.D., and Wood, L.M. (2010). Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. Semin. Immunol. *22*, 183–189.

Perez-Diez, A., Joncker, N.T., Choi, K., Chan, W.F.N., Anderson, C.C., Lantz, O., and Matzinger, P. (2007). CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. Blood *109*, 5346–5354.

Peterson, A.C., Harlin, H., and Gajewski, T.F. (2003). Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma. J. Clin. Oncol. *21*, 2342–2348.

Petrul, H.M., Schatz, C.A., Kopitz, C.C., Adnane, L., McCabe, T.J., Trail, P., Ha, S., Chang, Y.S., Voznesensky, A., Ranges, G., et al. (2012). Therapeutic mechanism and efficacy of the antibody-drug conjugate BAY 79-4620 targeting human carbonic anhydrase 9. Mol. Cancer Ther. *11*, 340–349.

Pihlgren, M., Arpin, C., Walzer, T., Tomkowiak, M., Thomas, A., Marvel, J., and Dubois, P.M. (1999). Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. Int. Immunol. *11*, 699–706.

Polack, B., Vergnaud, S., Paclet, M.H., Lamotte, D., Toussaint, B., and Morel, F. (2000). Protein delivery by Pseudomonas type III secretion system: Ex vivo complementation of p67(phox)-deficient chronic granulomatous disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. *275*, 854–858.

Precopio, M.L., Betts, M.R., Parrino, J., Price, D.A., Gostick, E., Ambrozak, D.R., Asher, T.E., Douek, D.C., Harari, A., Pantaleo, G., et al. (2007). Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. J. Exp. Med. *204*, 1405–1416.

Préville, X., Ladant, D., Timmerman, B., and Leclerc, C. (2005). Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. Cancer Res. *65*, 641–649.

Q

Quénée, L. (2004). Mécanisme de sécrétion des toxines ExoS et ExoT par le système de sécrétion de type III de P. aeruginosa: séquence d'adressage et rôle des chaperonnes spécialisées. Thèse de sciences, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Quénée, L., Lamotte, D., and Polack, B. (2005). Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in pseudomonas aeruginosa. BioTechniques *38*, 63–67.

Quezada, S.A., Simpson, T.R., Peggs, K.S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P.A., et al. (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. J. Exp. Med. *207*, 637–650.

R

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annu. Rev. Immunol. *25*, 267–296.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. Nature Reviews Immunology *6*, 476–483.

Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat. Rev. Immunol. *12*, 269–281.

Ribas, A., Timmerman, J.M., Butterfield, L.H., and Economou, J.S. (2003). Determinant spreading and tumor responses after peptide-based cancer immunotherapy. Trends Immunol. *24*, 58–61.

Rini, B.I., Campbell, S.C., and Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. Lancet *373*, 1119–1132.

Ritchie, A.J., Yam, A.O.W., Tanabe, K.M., Rice, S.A., and Cooley, M.A. (2003). Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. Infect. Immun. *71*, 4421–4431.

Ritchie, A.J., Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., and Cooley, M.A. (2005). The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. Infect. Immun. *73*, 1648–1655.

Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2004). Cutting edge: effector memory CD8+ T cells play a prominent role in recall responses to secondary viral infection in the lung. J. Immunol. *172*, 6533–6537.

Robertson, N., Potter, C., and Harris, A.L. (2004). Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. Cancer Res. *64*, 6160–6165.

Rodríguez, T., Méndez, R., Del Campo, A., Aptsiauri, N., Martín, J., Orozco, G., Pawelec, G., Schadendorf, D., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2007). Patterns of constitutive and IFN-gamma inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines. Immunogenetics *59*, 123–133.

Roithmaier, S., Haydon, A.M., Loi, S., Esmore, D., Griffiths, A., Bergin, P., Williams, T.J., and Schwarz, M.A. (2007). Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. J. Heart Lung Transplant. *26*, 845–849.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat. Med. *10*, 909–915.

Rosenberg, S.A., Sherry, R.M., Morton, K.E., Scharfman, W.J., Yang, J.C., Topalian, S.L., Royal, R.E., Kammula, U., Restifo, N.P., Hughes, M.S., et al. (2005). Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. J. Immunol. *175*, 6169–6176.

Rothman, J., and Paterson, Y. (2013). Live-attenuated Listeria-based immunotherapy. Expert Rev Vaccines *12*, 493–504.

Rüssmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galán, J.E., and Donis, R.O. (1998). Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. Science *281*, 565–568.

S

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature *401*, 708–712.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annu. Rev. Immunol. *22*, 745–763.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. J. Exp. Med. *205*, 625–640.

Savage, P.A., Malchow, S., and Leventhal, D.S. (2013). Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. Trends Immunol. *34*, 33–40.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nat. Immunol. *1*, 426–432.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science *331*, 1565–1570.

Sedlakova, O., Svastova, E., Takacova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. Front Physiol *4*, 400.

Seong, S.-Y., and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nat. Rev. Immunol. *4*, 469–478.

Shafee, N., Kaluz, S., Ru, N., and Stanbridge, E.J. (2009). PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines. Cancer Lett. *282*, 109–115.

Shafer-Weaver, K.A., Watkins, S.K., Anderson, M.J., Draper, L.J., Malyguine, A., Alvord, W.G., Greenberg, N.M., and Hurwitz, A.A. (2009). Immunity to murine prostatic tumors: continuous provision of T-cell help prevents CD8 T-cell tolerance and activates tumor-infiltrating dendritic cells. Cancer Res. *69*, 6256–6264.

Shahabi, V., Maciag, P.C., Rivera, S., and Wallecha, A. (2010). Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. Bioeng Bugs *1*, 235–243.

Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2011). Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. Nat. Rev. Cancer *11*, 805–812.

Shedlock, D.J., and Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. Science *300*, 337–339.

Shimizu, K., Uemura, H., Yoshikawa, M., Yoshida, K., Hirao, Y., Iwashima, K., Saga, S., and Yoshikawa, K. (2003). Induction of antigen specific cellular immunity by vaccination with peptides from MN/CA IX in renal cell carcinoma. Oncol. Rep. *10*, 1307–1311.

Shin, H.-J., Rho, S.B., Jung, D.C., Han, I.-O., Oh, E.-S., and Kim, J.-Y. (2011). Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. J. Cell. Sci. *124*, 1077–1087.

Shvarts, O., Janzen, N., Lam, J.S., Leppert, J.T., Caliliw, R., Figlin, R.A., Belldegrun, A.S., and Zeng, G. (2006). RENCA/carbonic anhydrase-IX: a murine model of a carbonic anhydrase-IX-expressing renal cell carcinoma. Urology *68*, 1132–1138.

Siebels, M., Rohrmann, K., Oberneder, R., Stahler, M., Haseke, N., Beck, J., Hofmann, R., Kindler, M., Kloepfer, P., and Stief, C. (2011). A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX®) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients. World J Urol *29*, 121–126.

De Simone, G., and Supuran, C.T. (2010). Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. Biochim. Biophys. Acta *1804*, 404–409.

Skoberne, M., Yewdall, A., Bahjat, K.S., Godefroy, E., Lauer, P., Lemmens, E., Liu, W., Luckett, W., Leong, M., Dubensky, T.W., et al. (2008). KBMA Listeria monocytogenes is an effective vector for DC-mediated induction of antitumor immunity. J. Clin. Invest. *118*, 3990–4001.

Skoble, J., Beaber, J.W., Gao, Y., Lovchik, J.A., Sower, L.E., Liu, W., Luckett, W., Peterson, J.W., Calendar, R., Portnoy, D.A., et al. (2009). Killed but metabolically active Bacillus anthracis vaccines induce broad and protective immunity against anthrax. Infect. Immun. *77*, 1649–1663.

Srivastava, P.K., and Amato, R.J. (2001). Heat shock proteins: the "Swiss Army Knife" vaccines against cancers and infectious agents. Vaccine *19*, 2590–2597.

Stark, F.C., Sad, S., and Krishnan, L. (2009). Intracellular bacterial vectors that induce CD8(+) T cells with similar cytolytic abilities but disparate memory phenotypes provide contrasting tumor protection. Cancer Res. *69*, 4327–4334.

Starks, H., Bruhn, K.W., Shen, H., Barry, R.A., Dubensky, T.W., Brockstedt, D., Hinrichs, D.J., Higgins, D.E., Miller, J.F., Giedlin, M., et al. (2004). Listeria monocytogenes as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. J. Immunol. *173*, 420–427.

Steinman, R.M., and Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. Nature *449*, 419–426.

Stillebroer, A.B., Mulders, P.F.A., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., and Oosterwijk, E. (2010). Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. Eur. Urol. *58*, 75–83.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature *406*, 959–964.

Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity *30*, 180–192.

Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. Science *300*, 339–342.

Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. Nat. Immunol. *5*, 927–933.

Supuran, C.T. (2008a). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nat Rev Drug Discov *7*, 168–181.

Supuran, C.T. (2008b). Development of small molecule carbonic anhydrase IX inhibitors. BJU Int. *101 Suppl 4*, 39–40.

Surfus, J.E., Hank, J.A., Oosterwijk, E., Welt, S., Lindstrom, M.J., Albertini, M.R., Schiller, J.H., and Sondel, P.M. (1996). Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with in vitro and in vivo interleukin-2-activated effectors. J Immunother Emphasis Tumor Immunol *19*, 184–191.

Svastova, E., Witarski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., Zatovicova, M., Barathova, M., Kopacek, J., Pastorek, J., et al. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. J. Biol. Chem. *287*, 3392–3402.

Svastová, E., Zilka, N., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Ciampor, F., Pastorek, J., and Pastoreková, S. (2003). Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. Exp. Cell Res. *290*, 332–345.

Svastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Pastorek, J., et al. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett. *577*, 439–445.

Swietach, P., Wigfield, S., Cobden, P., Supuran, C.T., Harris, A.L., and Vaughan-Jones, R.D. (2008). Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths. J. Biol. Chem. *283*, 20473–20483.

Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C.T., Harris, A.L., and Vaughan-Jones, R.D. (2009). The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular ph in three-dimensional tumor cell growths. J. Biol. Chem. *284*, 20299–20310.

Swietach, P., Hulikova, A., Vaughan-Jones, R.D., and Harris, A.L. (2010). New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. Oncogene *29*, 6509–6521.

T

Tacken, P.J., de Vries, I.J.M., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. Nat. Rev. Immunol. *7*, 790–802.

Touisni, N., Maresca, A., McDonald, P.C., Lou, Y., Scozzafava, A., Dedhar, S., Winum, J.-Y., and Supuran, C.T. (2011). Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. J. Med. Chem. *54*, 8271–8277.

Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., and Le Gouëllec, A. (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. Expert Rev Vaccines *12*, 1139–1154.

Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu. Rev. Immunol. *23*, 975–1028.

Tso, C.L., Zisman, A., Pantuck, A., Calilliw, R., Hernandez, J.M., Paik, S., Nguyen, D., Gitlitz, B., Shintaku, P.I., de Kernion, J., et al. (2001). Induction of G250-targeted and T-cell-mediated antitumor activity against renal cell carcinoma using a chimeric fusion protein consisting of G250 and granulocyte/monocyte-colony stimulating factor. Cancer Res. *61*, 7925–7933.

U

Uemura, H., Nakagawa, Y., Yoshida, K., Saga, S., Yoshikawa, K., Hirao, Y., and Oosterwijk, E. (1999). MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. Br. J. Cancer *81*, 741–746.

Uemura, H., Fujimoto, K., Tanaka, M., Yoshikawa, M., Hirao, Y., Uejima, S., Yoshikawa, K., and Itoh, K. (2006). A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. Clin. Cancer Res. *12*, 1768–1775.

Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., Ni, L., Flamar, A.-L., Zurawski, S., Zurawski, G., Palucka, K., Banchereau, J., and Oh, S. (2011). Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. Semin. Immunol. *23*, 21–27.

V

Vaccari, M., Trindade, C.J., Venzon, D., Zanetti, M., and Franchini, G. (2005). Vaccine-induced CD8+ central memory T cells in protection from simian AIDS. J. Immunol. *175*, 3502–3507.

Vance, R.E., Rietsch, A., and Mekalanos, J.J. (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of Pseudomonas aeruginosa PAO1 in vivo. Infect. Immun. *73*, 1706–1713.

Vanderlugt, C.L., and Miller, S.D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. *2*, 85–95.

Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., Eppolito, C., Sapoznikov, A., Amessou, M., Quintin-Colonna, F., et al. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. Eur. J. Immunol. *36*, 1124–1135.

Vissers, J.L., De Vries, I.J., Schreurs, M.W., Engelen, L.P., Oosterwijk, E., Figdor, C.G., and Adema, G.J. (1999). The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res. *59*, 5554–5559.

W

Walzer, T., Marçais, A., Saltel, F., Bella, C., Jurdic, P., and Marvel, J. (2003). Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. J. Immunol. *170*, 1615–1619.

Wang, Y., Wang, X.-Y., Subjeck, J.R., and Kim, H.L. (2010). Covalent crosslinking of tumor antigens stimulates an antitumor immune response. Vaccine *28*, 6613–6620.

Wang, Y., Gouëllec, A.L., Chaker, H., Asrih, H., Polack, B., and Toussaint, B. (2012). Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. J. Immunother. *35*, 223–234.

Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nat. Immunol. *4*, 225–234.

Williams, M.A. (2013). Instant Recall: A Key Role for Effector-Phenotype CD8+ Memory T Cells in Immune Protection. Immunity *38*, 1090–1091.

Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. Annu. Rev. Immunol. *25*, 171–192.

Wollowitz, S. (2001). Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. Semin. Hematol. *38*, 4–11.

Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. Cancer Res. *60*, 7075–7083.

X

Xie, Y., Akpinarli, A., Maris, C., Hipkiss, E.L., Lane, M., Kwon, E.-K.M., Muranski, P., Restifo, N.P., and Antony, P.A. (2010). Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. J. Exp. Med. *207*, 651–667.

Xu, C., Lo, A., Yammanuru, A., Tallarico, A.S.C., Brady, K., Murakami, A., Barteneva, N., Zhu, Q., and Marasco, W.A. (2010). Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. PLoS ONE *5*, e9625.

Y

Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentschev, I., Goebel, W., and Szalay, A.A. (2004). Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. Nat. Biotechnol. *22*, 313–320.

Z

Zatovicova, M., Jelenska, L., Hulikova, A., Csaderova, L., Ditte, Z., Ditte, P., Goliasova, T., Pastorek, J., and Pastorekova, S. (2010). Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain. Curr. Pharm. Des. *16*, 3255–3263.

Závada, J., Závadová, Z., Pastorek, J., Biesová, Z., Jezek, J., and Velek, J. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. Br. J. Cancer *82*, 1808–1813.

Zavadova, Z., and Zavada, J. (2005). Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. Oncol. Rep. *13*, 977–982.

Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Liénard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., et al. (2004). Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. Cancer Res. *64*, 2865–2873.

Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nature Reviews Immunology *10*, 248–256.

ANNEXES

Publications d'une revue et d'un commentaire :

- Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., and Le Gouëllec, A. (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. Expert Rev Vaccines *12*, 1139–1154.

- Le Gouëllec, A., Chauchet, X., Polack, B., Buffat, L., and Toussaint, B. (2012). Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. Hum Vaccin Immunother *8*, 1454–1458.

SPECIAL FOCUS | New Developments in Cancer Vaccines

Review

EXPERT REVIEWS

Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector

Expert Rev. Vaccines 12(10), 1139–1154 (2013)

Bertrand Toussaint*[1,2], Xavier Chauchet[1,2], Yan Wang[1], Benoit Polack[1,3] and Audrey Le Gouëllec[1,2]

[1]*Laboratoire TIMC-IMAG/TheREx (UMR 5525 CNRS-UJF), UFR de médecine, Université Joseph Fourier Grenoble I, 38700 La Tronche Cedex, France*
[2]*Département de Biochimie, Pharmacologie et Toxicologie, UM Biochimie des Enzymes et des Protéines, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, BP 217 - 38043 Grenoble, France*
[3]*Département d'Hématologie Oncologie Génétique et Immunologie, Institut de Biologie et Pathologie, C.H.U. de Grenoble, BP 217 - 38043 Grenoble, France*
**Author for correspondence: btoussaint@chu-grenoble.fr*

In the emerging field of active and specific cancer immunotherapy, strategies using live-attenuated bacterial vectors have matured in terms of academic and industrial development. Different bacterial species can be genetically engineered to deliver antigen to APCs with strong adjuvant effects due to their microbial origin. Proteic or DNA-encoding antigen delivery routes and natural bacterial tropisms might differ among species, permitting different applications. After many academic efforts to resolve safety and efficacy issues, some firms have recently engaged clinical trials with live *Listeria* or *Salmonella* spp. We describe here the main technological advances that allowed bacteria to become one of the most promising vectors in cancer immunotherapy.

KEYWORDS: attenuation • cancer vaccine • danger signal • listeriolysin • *Listeria monocytogenes* • live bacteria • *Pseudomonas aeruginosa* • *Salmonella typhimurium* • type 3 secretion system

In vivo therapeutic cancer vaccine strategies based on vectors that directly deliver antigens or nucleic acids encoding antigens to the cytosol of APCs, have been developed in academic laboratories and pharmaceutical industry due to their ease of use. These vectors include viruses, virus-like particles, plasmid DNA, peptides, chimeric proteins and bacteria. More than a century ago, William Coley developed the first bacterial-based cancer immune treatment by injecting killed Gram-positive and Gram-negative bacteria directly into a tumor after having observed regression of the tumor subsequent to bacterial injection [1]. But then historically, bacteria were first used for vaccines against bacterial infections. Induction of a humoral and/or cellular immune response can be achieved by administration of attenuated or killed strains derived from pathogenic bacteria to protect the host against a subsequent challenge with the respective pathogen. Live-attenuated or killed bacteria have long been used as prophylactic vaccines; hence, extensive clinical data are available, and firms have expertise in preparing and formulating this type of vaccine. However, more recent advances in the understanding of molecular biology, the lifestyles of pathogenic bacteria, bacterial engineering and synthetic biology tools have significantly accelerated the rational design of bacteria as antigen delivery vectors. To confer protection against self-antigens, live-attenuated bacteria are also viewed as promising carriers for antigenic message delivery *in vivo* and breaking the tolerance in order to induce a broad immune response against heterologous antigens. Indeed, bacterial vectors that deliver antigenic messages are also able to deliver a strong danger signal mediated by their pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipopolysaccharides, lipoproteins, flagellin and CpG. PAMPs derived from different classes of pathogens bind to diverse families of pathogen recognition receptors (PRRs) that include Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin-like receptors (CLRs), retinoic acid-inducible gene (*RIG*)-like receptors (RLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs). These interactions according to each pathogen trigger distinct signaling pathways to differentially activate APCs, thereby directing the adaptive effector response in a manner that is specifically adapted to the microbe and hence to the antigen delivered by the bacteria. Moreover, specialized toxins that bacteria use for their own virulence can reinforce effector or memory responses. Thus, many firms have recently engaged in clinical trials using live bacterial antigen vectors based on *Listeria* or *Salmonella* spp. (see below).

Compared to other types of vaccine carriers, bacteria-based antigen delivery vectors exhibit multiple advantages: i) the possibility to control its intrinsic infectious power (i.e., variety

 10.1586/14760584.2013.836914 © 2013 Informa UK Ltd ISSN 1476-0584

of well-characterized virulence-attenuating mutations and available antibiotherapy), ii) its non-integrative properties, iii) the ability to regulate the amount and *in vivo* localization of antigen expression, iv) the potential for multiple vaccine delivery routes and v) potent stimulation of the innate and adaptive immune systems.

In this review, we focus on extensive efforts that have been undertaken in recent decades in academic laboratories to improve the safety and efficacy of different bacteria as vaccine carriers for cancer immunotherapy until clinical phases [2,3]. The challenge is to demonstrate efficacy in cancer patients while ensuring complete safety for both patients and the environment because these vectors are live genetically transformed organisms. Thus, the optimal bacteria type (species and mode of antigen delivery to APCs), strategy for attenuating virulence and dissemination, and route of vaccine administration remain to be determined. Here, we describe the progress made in these fields to initiate a new era of live bacterial vaccines.

Engineering bacteria for heterologous antigen expression

Attenuated bacterial strains have been primarily exploited as potential vaccine vectors to deliver different types of antigenic messages for activating antitumor immune responses. However, these bacteria are mainly used to deliver either DNA or proteins. In both cases, genetic information encoding antigen and delivery tools has to be added and maintained in the bacterial cells to achieve the correct expression and efficient delivery of antigens during the vaccination process.

Antigens can be expressed heterologously in bacteria either through chromosomal integration of antigen-coding cassettes or by plasmid-based antigen expression systems. Chromosomal expression offers several advantages, including mostly genetic stability, the possibility of integrating and expressing multiple antigen genes and the lack of a requirement for antibiotic resistance gene expression. However, an inherent disadvantage of this strategy is that, in general, only one copy of the antigen gene will be expressed per bacterial cell, which might lead to poor antigen expression and inefficient protection. This limitation can be circumvented by highly active promoters that result in very high levels of target antigen expression and secretion or plasmid-based antigen expression systems to regulate the quantity and location of antigen expression. The amount of antigen expression can be controlled using high-copy or low-copy plasmid and inducible systems that produce abundant antigens upon the addition of an inducing agent. The location of antigen expression can be controlled *in vivo* to provide the maximal antigen dose depending on sub-cellular localization [4]. Plasmid maintenance in bacteria often requires antibiotic resistance markers, which might limit the use of these vectors in clinical applications. To overcome this obstacle, balanced lethal systems have been applied to replace antibiotic resistance markers to stabilize plasmids. These systems utilize plasmid-mediated complementation of genetically modified deficient strains. The plasmids encode an essential element required for bacterial growth and replication, thus forcing the bacterium to retain the plasmid. A variety of balanced lethal vectors have been developed based on either active containment features by expressing toxin-antitoxin components or passive containment characteristics, such as the complementation of genetic defects in DNA precursor, amino acid and cell wall biosynthetic pathways [5,6]. For instance, *Listeria monocytogenes (L. monocytogenes)* possesses a major activator of virulence genes, a pluripotential transcription factor, named pfrA for positive regulatory factor of listeriolysin A. A *pfrA* mutant is avirulent and complementation with episomal *pfrA* gene, which allows retention *in vivo* of the plasmid. Based on a similar approach, another complementation mechanism with *DAL* gene, which encode an enzyme responsible for the synthesis of a component of the cell wall, D-alanine, has been developed by Advaxis Inc. company (Δ*dal* Δ*dat*), thereby obviating the need of antibiotic resistance cassette [7].

The different modes of antigen delivery in APCs

For bacteria-mediated antigen delivery, two major engineered, natural processes are being widely explored in preclinical as well in clinical studies: pathogens with a natural intracellular tropism, such as the commonly used *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp., and type III secretion systems (T3SSs) for *in situ* translocation of heterologous antigens (Figure 1).

L. monocytogenes is a Gram-positive facultative intracellular bacterium that can cause listeriosis in both animals and humans and invades cells either through direct phagocytosis or by binding to host cells via virulence factors called internalins (InIA and InIB) [8]. Once inside the phagosome, the majority of the bacteria can be killed and degraded. However, a small fraction of bacteria (~5–10%) can escape degradation and enter the cytosol. This phagosomal escape is mainly mediated by the action of two virulence factors: listeriolysin O (LLO) and phospholipase C. Both of these proteins can degrade the phagosomal membrane, permitting the release of bacteria into the cytoplasm, where they undergo cell division. In the cytoplasm, the expression of ActA, an actin polymerase, allows *L. monocytogenes* to polymerize host cell actin monomers to facilitate motility. Ultimately, motile bacteria move to the periphery of the cell, where they form pseudopod-like structures that are recognized and internalized by neighboring adjacent cells, in which the cycle is subsequently repeated. Through the direct cell-to-cell transfer mechanism, *L. monocytogenes* can spread without leaving the intracellular compartment [9,10]. Due to this dual intracellular lifestyle, antigens secreted by *L. monocytogenes* can be targeted for both MHC class I and II presentation on the cell surface.

Salmonella is a Gram-negative intracellular bacterium that causes salmonellosis. Generally, *Salmonella* infects humans and animals by the oral–fecal route. Once inside the host, *Salmonella* can invade the intestinal mucosa and, subsequently, be captured by phagocytes. In contrast to *L. monocytogenes, Salmonella* lacks a phagosomal escape mechanism. After invasion into mammalian cells, its intracellular survival and replication are

restricted within phagosomes. To survive in this compartment, *Salmonella* can express several virulence factors encoded by the *phoP* locus, and these molecules can induce the formation of spacious vacuoles from phagosomes, allowing bacterial persistence and growth in these organelles [11]. Antigens secreted by *Salmonella* are degraded in the phagosome and are treated as exogenous antigens and presented predominantly via MHC II molecules

T3SSs are critical virulence factors used by a broad spectrum of Gram-negative pathogenic bacteria (*Salmonella, Shigella, Yersinia* and *Pseudomonas*, etc.) to deliver effector proteins (exotoxins) to the membrane or into the cytoplasm of host cells. The activation of T3SSs can be induced *in vivo* via bacterium-host cell contact. Prior to contact, most of the effector proteins are expressed and stored within bacteria [12]. Exotoxins are targeted to the T3SS by a signal sequence. When an antigen of interest is fused to this signal sequence, the resulting recombinant chimeric protein can also be engaged by the T3SS and delivered to the cytosol of APCs, which are often targeted by pathogens to disrupt the immune response and favor natural infection. Russmann *et al.*, demonstrate the benefit to use the type III secretion system of *Salmonella* to deliver antigenic protein to HLA class-I compartment of APCs and to elicit T-cell protective immunity [13]. Several reports describe the use of type III secretion system to deliver antigenic protein and boost specific-T-cell response [14–18].

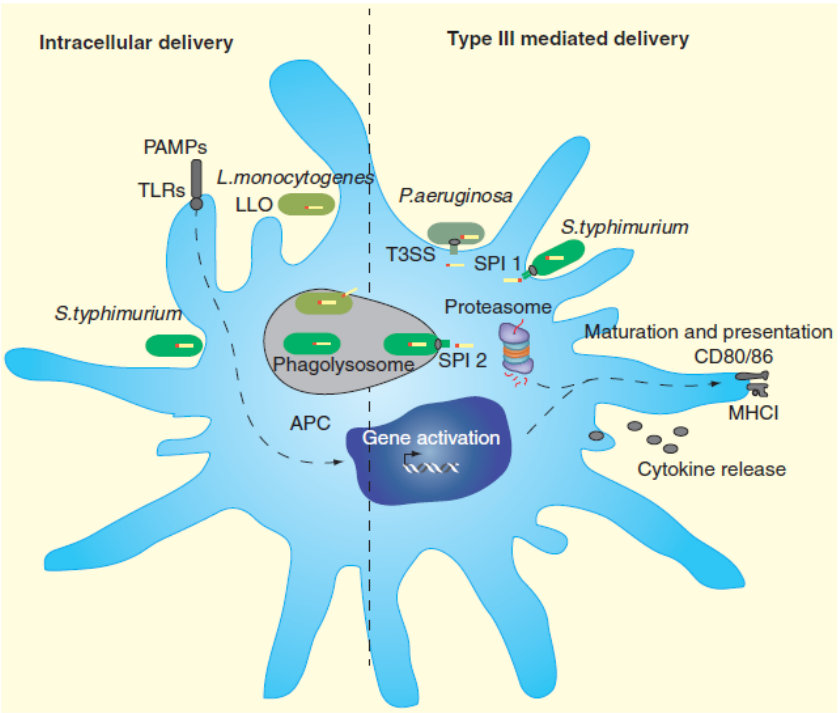


Figure 1. The different modes of antigen delivery inside APCs by genetically engineered bacteria.
APC: Antigen presenting cell; LLO: Lysteriolysin; PAMPs: Pathogen associated molecular patterns; SPI: Salmonella pathogenicity island; TLR: Toll like receptor; T3SS: Type 3 secretion system.

Bacteria as protein vectors for cancer immunotherapy

As cancer vaccine carriers, bacteria have long been used for protein delivery. In this case, the antigenic proteins are not produced by the host cells but by the bacteria *in situ*. The bacteria also act as adjuvants. The delivery of heterologous protein antigens by *L. monocytogenes* to the immune system with the induction of CTL responses was first demonstrated in 1992 [19]. Since then, *L. monocytogenes* has been successfully explored as a vaccine vector for the delivery of antigens in diverse models [20–22] and evaluated under US investigational new drug for the first time by Aduro Biotech Inc. In nearly all preclinical studies of *L. monocytogenes* as a carrier to deliver tumor antigens, antitumor efficacy has been achieved when the antigen was expressed as a fusion protein with the truncated listerial virulence factors LLO or ActA. Table 1 summarizes major recent preclinical studies of the use of *L. monocytogenes* to deliver tumor-associated antigens (TAAs) for cancer immunotherapy in different tumor models. *L. monocytogenes* as a cancer vaccine carrier for human disease has entered Phase II clinical trials.

To date, two *Salmonella* serovars, *S. typhi* and *S. typhimurium*, have been extensively assessed as live vectors for antigen delivery for the design and development of new vaccines for human diseases [23]. As mentioned previously, antigens carried by *Salmonella* are generally targeted to the MHC II antigen processing pathway and in predominantly Th2-type immune responses. This inherent characteristic prevents the delivery of heterologous antigens to the host cell cytosol and their engagement in the MHC I antigen processing pathway. To overcome this hurdle, several strategies have been established: a modified *Salmonella* was created to carry a construct encoding LLO from *L. monocytogenes*, which has been shown to facilitate escape from phagosomes; the hemolysin (HlyA) secretion system of *Escherichia coli*, a prototypical type I secretion system, was applied in *Salmonella* to favor the secretion of the tumor antigen [24]; heterologous antigen was fused to cholera toxin subunit B (a potent mucosal adjuvant), to enhance antigen secretion and uptake by APCs and consequently induce protective cell-mediated immunity [25]. Major efforts have focused on exploiting the distinctive intracellular protein-translocation machinery of the T3SS of *Salmonella* to promote the cytosolic delivery of antigens and thus improve the performance of these vaccines. In *Salmonella*, there are two types of T3SSs, which are encoded by *Salmonella* pathogenicity island-1 (SPI-1) and *Salmonella* pathogenicity island-2 (SPI-2). Studies, in several infectious models, have demonstrated that when peptide fragments from

Table 1. Live-recombinant bacteria-mediated antigen delivery for anti-tumor immunotherapy in animal models.

Antigen delivery mechanism	Concerned cancer model	Targeted antigen	Bacterial vaccine strain	Expression system	Ref.
Microbial phagocytosis	Cervical	HPV16-E7	*Lm*–LLO-E7/*Lm*–E7	Plasmid/chromosomal	[60,61]
			Lm–LLO-E7, *Lm*–Acta-E7	Plasmid	[62]
			Lm–Acta-E7	Plasmid	[63]
			Lm–LLO-E7, *Lm*–PEST-E7	Plasmid	[64]
			rLm-E7	Chromosomal	[65]
			Lm (Δdal Δdat)–LLO-E7	Plasmid	[66]
			Lm (ΔactAΔplcB)–E7	Chromosomal	[67]
		HPV16-L1	*Lm*–LLO-L1 (fragment)	Plasmid	[68]
	Breast	Her2/neu	*Lm*–LLO-Her2/neu (fragment)	Plasmid	[69,70]
			Lm–LLO-ChHer2/neu	Plasmid	[71]
			Lm(Δdal Δdat ΔactA)–LLO-ChHer2/neu	Plasmid	[72]
		VEGFR2	*Lm*– LLO-Flk-1 (fragment)	Plasmid	[71]
		Endoglin	*Lm*–LLO-CD105 (fragment)	Plasmid	[73]
		MAGE-b	*Lm*–LLO-Mage-b (fragment)	Plasmid	[74]
		ISG15	*Lm*–LLO-ISG15	Plasmid	[75]
	Papilloma	CRPV	E1–*rLM*	Chromosomal	[76]
	Melanoma	HMW-MAA	*Lm*–LLO-HMW-MAA (fragment)	Plasmid	[77]
		TRP2	*Lm*–TRP2 (fragment)	Plasmid	[78]
	Colon	GP70	*Lm (ΔactAΔinlB)*–LLO-AH1-A5(epitope)	Chromosomal	[49]
	Prostate	PSA	*Lm*–LLO–hPSA	Chromosomal	[79]
			Lm (Δdal Δdat ΔactA)–hPSA	Plasmid	[7,80]
T3SS mediated cytosolic translocation	Melanoma	TRP2	*S. typhimurium* (SL3261)–$SopE_{1-100}$-$TRP2_{153-417}$-HSP_{70}	Plasmid	[81]
		VEGFR2/Flk-1	*S. typhimurium* (SB824)–$YopE_{1-138}$-$VEGFR2_{352-411}$	Plasmid	[82]
	Colon	hSurvivin	*S. typhimurium MvP728 (ΔpurD/ΔhtrA)*–SseF-hSurvivin	Plasmid	[31]
	Hepatocellular carcinoma	Hepatitis B virus x (HBx)	*S. typhimurium* (SL3261)–SspH2-HBx	Plasmid	[83]
	Fibrosarcoma	p60	*S. typhimurium* (SB824)–$YopE_{1-138}$-$p60_{130-477}$-M_{45}	Plasmid	[18,84]
	Sarcoma	NY-ESO-1	*S. typhimurium(ΔphoP ΔphoQ)*–$SopE_{1-100}$-NY-ESO-1-M_{45}	Plasmid	[85]

LLO: Lysteriolysin; *Lm: L. monocytogenes; P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa.*

Table 1. Live-recombinant bacteria-mediated antigen delivery for anti-tumor immunotherapy in animal models (cont.).

Antigen delivery mechanism	Concerned cancer model	Targeted antigen	Bacterial vaccine strain	Expression system	Ref.
T3SS mediated cytosolic translocation (cont.)	Glioblastoma	hSurvivn	*S. typhimurium, MvP728 (ΔpurD/ΔhtrA)*–SseF/hSurvivin	Plasmid	[31]
		TRP2	*P. aeruginosa(ΔexoS/ΔexoT)*–$ExoS_{1-54}$-$TRP2L_{125-376}$	Plasmid	[35]
			P. aeruginosa(ΔexoS/ΔexoT/ΔaroA/Δlasl)– $ExoS_{1-54}$-$TRP2L_{125-376}$	Plasmid	[36]

LLO: Lysteriolysin; *Lm: L. monocytogenes; P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa.*

pathogenic viruses or bacteria are fused to *Salmonella* T3SS effector proteins such as SopE and SptP of SPI-1 T3SS or SspH2 and SseF of SPI-2 T3SS, they can be engaged by the T3SS and delivered to the host cell cytosol, resulting in the priming of a protective class I-restricted immune response [26–30]. Interestingly, some effectors of SPI-2 T3SS are only expressed when *Salmonella* are inside host cells, preferentially macrophages or DCs [31]. Based on these findings, the performance of *Salmonella*-based vaccines has been enhanced and confirmed in different infectious or tumor models. Moreover, the *Salmonella* genus itself possesses inherent tumor targeting capacity coupled to antitumor activity. This could be of potential interest in cancer therapeutics; clinical Phase I applications of an attenuated *S. typhimurium* strain administered iv. or intratumorally to a heterogeneous group of cancer patients resulted in tumor colonization and mild side effects [32,33].

In addition, T3SS-mediated antigen delivery has been applied using other live-attenuated bacterial strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*. In contrast to other investigated bacterial vectors, *P. aeruginosa* is an extracellular pathogen. That particular lifestyle among the other bacteria used for immunotherapy could be responsible of a particular immune response (against extracellular pathogen) and reinforce the need to evaluate carefully the interest of that platform for cancer immunotherapy. Moreover, it is not administrated by enteral route lowering therefore the concern of environmental dissemination through feces. In our laboratory, we have engineered a series of attenuated *P. aeruginosa* strains to express TAAs. Intracytoplasmic antigen delivery was established by fusing the antigens of interest with the first 54 amino acids of the T3SS toxin ExoS. The efficiency of the antigen-specific CD8+ T-cell-mediated response activation and tumor protection ability of these attenuated T3SS-based bacterial vectors has been confirmed not only *in vitro* but also in murine models [16,34–36]. We have also summarized recent studies in preclinical stages that focused on exploiting bacteria with T3SSs as vaccine carriers for effective immunotherapeutic treatment of cancer (Table 1).

Bacteria as cDNA vectors for cancer immunotherapy

In the cancer vaccine field, bacterial carriers have also been designed to deliver plasmid cDNA to the immune system. For this purpose, the bacterial vectors carry plasmids encoding TAA genes that are under the control of a eukaryotic promoter, thereby expressing tumor antigens in eukaryotic cells after transfection. This process, also called 'bactofection', was initially developed by Goebel *et al.*, with *L. monocytogenes* [37]. Numerous bacterial strains have since been explored as DNA delivery vectors for inducing protective responses against infectious diseases as well as tumors. With few exceptions, most of the bacterial strains utilized *in vivo* for the delivery of vaccine plasmids are intestinal pathogens of humans or other mammals. The use of live-attenuated enteric bacteria-based vaccines permits colonic mucosa infections following oral administration. After crossing the intestinal mucosal barrier, mainly via M cells, a large fraction of bacterial carriers can be taken up by APCs, either in local lymphoid tissues or after systemic spread in the spleen, liver and lymph nodes [38]. After phagocytosis by the APCs, these bacteria either enter the cytosol of these cells, such as *Listeria* and *Shigella*, or remain in the phagosomal compartment, like *Salmonella*. A major advantage of delivering DNA instead of protein lies on the fact that DNA allows to circumvent gene expression challenges with bacteria. DNA enters in cells and follows almost normal post-translational processing important for proteins (for humoral responses and some CD4 responses). From here, the antigen can be further presented on MHC class I and II molecules to T cells. Bacteria-based cDNA delivery has been applied for the immune treatment of different types of cancer (Table 2). Most studies have relied on progress obtained by using bacteria in the *Salmonella* genus. Some studies have demonstrated that the delivery of plasmid cDNA by *L. monocytogenes* can stimulate CD8+ T cells *in vitro*; for example, the work of Souders *et al.*, demonstrated that the *L. monocytogenes* vector acted less effectively when it was used for DNA delivery than for protein delivery, which might be related to the delayed expression of the tumor antigen [39,40].

Table 2. Live-recombinant bacteria-mediated cDNA encoding antigens delivery for anti-tumor immunotherapy in animal models.

Concerned cancer model	Targeted antigen	Eukaryotic expression vector	Bacterial host strain	Ref.
Melanoma	GP100	pVAX-mgp100	*S. typhimurium* SL7207/ *S. typhimurium* SL7207yejE	[86]
	VEGFR2/flk1 hTERT/TRAIL/Smac	pcDNA3.1–flk1	*S. typhimurium* SL7207	[87]
		pCA13–Smac; pCA13–TRAIL; pSNhTS (pSNAV–hTERT-TRAIL-Smac)	*S. typhimurium* SL3261	[88]
	TRP2/GP100	pUb-M (pCMV-Ubiquitin-mGP100$_{25–33}$-TRP-2$_{181–188}$)	*S. typhimurium* SL7207	[89,90]
Breast	hTERT/TRAIL/Smac	pCA13–Smac; pCA13–TRAIL; pSNhTS (pSNAV–hTERT-TRAIL-Smac)	*S. typhimurium* SL3261	[88]
	MTDH/AEG-1	pUb-MTDH/AEG-1(pcDNA3.1/Ub-Myc–MTDH/AEG-1)	*S. typhimurium* RE88	[91]
	Endoglin (CD105)	pCMV–mEndoglin	*S. typhimurium* RE88	[92]
	Legumain	pLegu-H-2Dd (pCMV/Myc/ER–Legumain H-2Dd epitopes) pLegu-H-2Kd (pCMV/ Myc/ER–Legumain H-2Kd epitopes)	*S. typhimurium* RE88	[93]
	Fra-1	pUb-Fra-1 (pCMV–Ubiquitin-Fra-1) &pIL-18 (pCMV–IgK leader-mIL18)	*S. typhimurium* RE88	[94]
Lung	VEGFR2/flk1	pcDNA3.1-FLK1$_{ECD}$	*S. typhimurium* SL3261	[95]
	hTERT/TRAIL/Smac	pCA13–Smac; pCA13–TRAIL; pSNhTS (pSNAV–hTERT-TRAIL-Smac)	*S. typhimurium* SL3261	[88]
	CEA	pW–CEA	*S. typhimurium* SL7207	[96]
Colon	VEGFR2/flk1	pcDNA3.1–VEGFR2(n1-4); pcDNA3. 1– VEGFR2(n1-7)	*S. typhimurium* SL3261	[97]
	CEA	pW–CEA	*S. typhimurium* SL7207	[98]
		pHI-691 (pCMV-ER-HIVtat-CEA$_{691}$-*myc*)	*S. typhimurium* RE88	[99]
Neuroblastoma	Survivin	pUS-high (pCMV-F3Ub 21–survivin minigene)	*S. typhimurium* SL7207	[100]
	TH	pCMV-F3Ub–mTH minigene	*S. typhimurium* SL7207	[101]
	VEGFR2/flk1	pcDNA3.1–VEGFR2	*S. typhimurium* SL7207	[102]
Prostate	PSCA	pmPSCA (pIRES$_2$ DsRed$_2$–mPSCA)	*S. typhimurium* SL7207	[103]
Gastric	MG7-Ag	pcDNA3.1 (+)-MG7/PADRE	*S. typhimurium* SL3261	[104]
Cervical	HPV 16-E7	pNCS (pCMV–LLO-E7–polyA)	*L. monocytogenes L. monocytogenes*-LLO	[39]

L. monocytogenes: Listeria monocytogenes; S. typhimurium: Salmonella typhimurium; TH: Tyrosine hydroxylase.

Resolution of safety issues

Interest in using bacterial vectors for immunotherapy is related to their intrinsic antigen delivery abilities with concurrent immune system stimulation, which leads to the production of pro-inflammatory cytokines and APC maturation. Live-attenuated vaccines confer prolonged protection due to the inflammatory response to the microbial threat [41]. Vaccines against tuberculosis (BCG vaccine) and typhoid fever are examples of attenuated live bacteria vaccines that are acceptable for use to prevent infectious diseases in humans. To use pathogens as recombinant vaccine vectors in cancer patients, immunogenicity (desirable effects) must be segregated from toxicity (bad side effects). Recent advances in immunology and molecular and cellular pathophysiology have addressed this issue and provided new recombinant bacterial strains for human cancer vaccine use. Here, we present proposed strategies for attenuating bacterial virulence illustrated with preclinical and clinical data.

Attenuation by diminution of the replication capacities of the bacteria in the host

The infectivity of bacteria is in part due to their ability to divide and disseminate inside an infected host. Vaccines containing killed bacteria pose a relatively low-level threat to the host and do not correctly stimulate the immune system. Thus, viable attenuated microorganisms, which are primarily generated by the deletion of genes involved in specific metabolic pathways, have been tested.

For instance, the vaccine strain for typhoid fever, *S. typhi* Ty21a, is deficient in the synthesis of the enzyme uridine diphosphate (UDP)-galactose-4-epimerase (a mutation of the *galE* gene). When cultivated in glucose-free media, UDP-galactose cannot be metabolized, and it accumulates in the cytoplasm of the strain, causing cell lysis [42]. Among several tested strains, Xion *et al.*, found that the double-attenuated mutant of *S. typhimurium*, MvP728 (*ΔpurD/htrA*) is not toxic to mice and is a very effective platform to elicit antigen-specific memory CD8 T cells [31]. The *purD* gene encodes a protein that is involved in the purine ribonucleotide biosynthesis and *htrA* is a stress response gene that encodes a periplasmic protease that degrades aberrant proteins and reduces intracellular survival in human intestinal epithelial cells.

Another well-characterized metabolic pathway attenuation is the deletion of the *aroA* gene, which encodes 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, an enzyme involved in chorismate synthesis. This attenuation renders *Salmonella*, *Listeria* and *Pseudomonas* species auxotrophic for aromatic amino acids, and it alters siderophore synthesis, reducing the capacity for *in vivo* replication and eliminating pathogenicity [43,44].

Attenuation by diminution/suppression of virulence factor expression

Multiple virulence-attenuated vaccine vectors have also been developed.

In *Salmonella*, the most widely studied strains have mutations in the *phoP/phoQ* regulator system or in *Salmonella* SPI2. The transcriptional activator PhoP is an important virulence factor that induces the formation of spacious vacuoles from phagosomes and thus facilitates bacterial persistence. Other virulence genes or regulators of virulence have been proposed for attenuation in *Salmonella* clinical strains [45,46]. For instance, despite no clinical efficacy, Toso *et al.*, in 2002 tested in Phase I clinical study a double-mutant of *S. typhimurium* deleted for *purI* and *msbB* genes, two genes involved respectively in biosynthsesis of adenine and myristoylation of LPS lipid A domain [32].

Contrary to *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* cells do not contain LPS. *L. monocytogenes* possesses among other virulence factor, ActA, an enzyme involved in actin polymerization, in charge of bacterial dissemination from cell to cell. The deletion of *pclB*, which encodes one of the two bacterial phospholipase C genes and is required for release from the secondary vacuole, enhanced the attenuation of the toxicity of Δ*actA*. This strain was used in a Phase I clinical study and administered in a single oral dose (escalating from 10^6–10^9 cfu) without serious adverse effect. Among 20 healthy adults vaccinated, there were no positive blood cultures and no fevers attributable to the investigational product. Only one volunteer had a late positive stool culture at 8th weeks after inoculation with the vaccine strain, which was treated with antibiotherapy, and three volunteers had transient temporal elevations of serum transaminases [47]. Advaxis Inc. conduct the first clinical Phase I study of *L. monocytogenes* expressing the HPV16 E7 antigen, known as Lovaxin C, for patient with cervical cancer [48]. The intravenous injection of the attenuated strain XFL-7 (a Δ*pfrA* strain complemented with episomal *pfrA* on plasmid pGG55 as mentioned in paragraph "Engineering bacteria for heterologous antigen expression") was associated to flu-like syndrome consistent with bacterial 'infection' and an increase in the level of associated-cytokines. The safety and tolerability was proved at doses of up to 3.3×10^9 cfu and a Phase II clinical study is ongoing. However, Wallecha *et al.*, constructed the Δ*dal* Δ*dat* Δ*actA* strain and described it in a preclinical study as a new safer construction antibiotic resistance-free for effective use of live vector in clinic, irreversibly attenuated. The *dal* and *dat* genes are implicated in complementation of D-alanine metabolism (described in previous paragraph) and deletion of *actA* serve as important virulence attenuation [7]. The combination with the deletion of *inlB* (known as ANZ-100) blocks the direct uptake of *Listeria* by hepatocytes, limits bacterial growth in the liver and thus hepato toxicity [49]. The safety and tolerability of this live-attenuated strain of *L. monocytogenes* were evaluated and no adverse effect was observed in nine patients with liver metastases vaccinated up to dose 3 x 10^8 cfu (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00327652) [47]. The same strain further engineered to express mesothelin (*ΔactAΔinlB hMeso*), known as CRS-207, was also evaluated in Phase I study. The 17 subjects with cancer known to overexpress mesothelin were administered iv. and showed good tolerance [50]. Phase II clinical study in 90 patients with pancreatic cancer sponsored by Aduro Biotech Inc. is now fully enrolled (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01417000).

In *P. aeruginosa*, T3SS is one of virulence factors which is most strongly correlated with severe infection [51]. The molecular syringe composed of more than 20 proteins is devoted to inject toxins (ExoS, T, Y and U) into the cytosol of infected host's cells. The deletion of *exsA*, the gene encoding the major activator of the T3SS, abolishes the virulence of *P. aeruginosa* [52]. The deletion of the two major exotoxins, ExoS and ExoT, reduced the quantity of bacteria required for vaccination and increased safety in preclinical studies [34]. Deletion of the signaling pathway involved in virulence factor expression at high bacterial density also diminished toxicity while maintaining immunogenicity [43].

Killed but metabolically active vaccines

Killed but metabolically active (KBMA) bacteria represent a novel approach for obtaining attenuated whole microbes that are unable to cause infection but retain sufficient metabolic activity to induce immunity [53]. The vaccine is attenuated by photochemical treatment with a psoralen cross-linking agent (amotosalen hydrochloride, S59), which impacts DNA replication and blocks division. The random DNA lesions are irreversible due to a deletion of the genes for nucleotide excision repair (*uvrAB*), which is the primary mechanism by which bacteria repair psoralen-induced crosslinks. These gene deletions render microbial-based vaccines more sensitive to photochemical inactivation, and the number of crosslinks required to block division is very low (theoretically, only one crosslink is sufficient to block bacterial replication). Hence, as few adducts are present and randomly distributed, the bacterial genes required to proceed through the lifecycle of the parent organism are maintained and expressed. KBMA *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa* retain their intrinsic ability to infect host cells, express and deliver antigen *de novo* and elicit functional T-cell and long-term protective immunity, which correlates with vaccine efficacy in mouse models of infectious diseases and cancer [16,54].

Resolution of efficacy issues

Balancing virulence/toxicity & immunogenicity of a vaccine

For successful clinical applications, bacterial vectors must be safe while retaining the strong immunopotency of the initial virulent pathogen. The attenuation process reduces the virulence of the bacterium; however, we can improve the performance of attenuated bacterial vectors by optimizing the vaccination scheme. Using *P. aeruginosa*, we recently demonstrated that by modulating injection frequency and interval, a bacterial vaccination-activated immune response could be enhanced, and the *in vivo* therapeutic efficacy of bacterial vaccines could be improved. The optimized vaccination scheme induced a long-lasting CD8+ T-cell response. The poor infectivity of some attenuated strains could also be overcome by vaccinations at multiple loci to efficiently improve vaccination performance [36].

The capacity of bacteria to induce antigen-specific cellular responses is partially linked to their ability to stimulate significant innate immunity through the detection of PAMPs by pattern recognition receptors. Thus, complete ablation of virulence, particularly the deletion of genes encoding proteins involved in this process, will significantly corrupt the danger signal transmitted to the APC and interfere with APC activation and maturation. While inflammation is need, *Listeria* strains that activate the inflammasome are very poor inducers of protective T-cell based immunity [55]. Hence, understand which molecular events are benefits for cancer immunotherapy, is very important in order to rationally design new efficient vector.

Delivery of full-length antigens: a strong argument for bacterial vectors

Although the role of the CD8+ T-cell cytotoxic response to tumors has been well defined, it is now clear that the efficacy of a cancer vaccine is also dependent on its ability to stimulate CD4+ T helper lymphocytes. CD4+ T cells amplify the cytotoxic response by secreting immunostimulatory cytokines and promoting the development of a memory T-cell response. A key advantage of directing CD4+ and CD8+ T-cell responses against the tumor-antigen is the promotion of antigen presentation by both MHC I and MHC II molecules. Contrary to other vector as DC immunotherapy charged with peptide *ex vivo*, bacterial vectors (e.g., *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Pseudomonas* spp.) could produce whole or large part of the antigen. Indeed, full-length antigens can be delivered to the APC by both phagocytosis of the bacteria (presentation by MHC II or MHC I cross-presentation for DC) and by intracellular pathways (MHC I presentation), allowing the presentation of multi-antigenic epitopes to T cells independently of haplotypes of the vaccinated patient. These dual methods of full-length antigen delivery bypass the limitations associated with the use of short peptides or proteins (except cross-presentation), which are restricted to MHC I or MHC II alleles, respectively or unknown epitope targeting. For example, the use of chimeric proteins in which the tumor-associated antigen tyrosine-related protein 2 (TRP2) is fused to the pan HLA DR PADRE epitope vectorized by the T3SS of *P. aeruginosa* yields better immunization, with fewer Treg cells, than the use of TRP2 alone [35].

We demonstrated that large proteins (>70 kDa) can be correctly secreted and translocated by the T3SS of *P. aeruginosa* when fused to the N-terminal domain of the natural exotoxin, ExoS [56]. Furthermore, it is possible to develop more sophisticated expression systems that would allow, for example, the expression and delivery of two or more antigenic proteins [36] or assembly of multiple epitopes. Compared to single antigen delivery vectors, bi-antigen delivery vectors have several advantages, including better tumor rejection efficiency, simplicity of use and safety. This strategy could enhance the efficacy of a cancer vaccine by bypassing CD8 immunoselection of tumor variants lacking the expression of a given antigen, the mechanism by which tumors escape immune recognition [57].

Companies that are developing live-attenuated bacterial vectors in clinical trials

Three companies are actively performing clinical studies with bacterial vectors (Table 3). Another company completed a Phase I trial of a *S. typhimurium*-based cancer immunotherapy but was liquidated in 2010 (VION Pharmaceuticals Inc.). Two competitors, Advaxis Inc. and Aduro Biotech Inc., have performed the most advanced trials of live-attenuated *L. monocytogenes*, but more recently, a young Swiss-German-based vaccine company, VAXIMM Inc., entered a first-in-

Table 3. Clinical trials with live-attenuated bacterial vectors for cancer immunotherapy.

Trial Name	Bacterial vector	Antigen	Indication	Trial status	Sponsors/ collaborators	Ref.
Vaccine therapy in treating patients with persistent or recurrent cervical cancer	*L. monocytogenes* ADXS11-001 (iv. route)	LLO-HPV16-E7	Persistent or recurrent Squamous or non-squamous cell Carcinoma of the cervix	Ongoing Phase II	Advaxis Inc. Gynecologic Oncology Group National Cancer Institute	[201]
An assessment of an attenuated live listeria vaccine in CIN 2+			Cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3	Ongoing Phase II	Advaxis Inc.	[202]
A Phase I/II evaluation of ADXS11-001, mitomycin, 5-FU and IMRT for anal cancer			Anal cancer	Ongoing Phase I/II	Brown University†	[203]
Safety study of recombinant *lm* based vaccine virus vaccine to treat oropharyngeal cancer			HPV-16 +ve Oropharyngeal carcinoma	Ongoing Phase I/II	University of Liverpool‡	[204]
Phase I study of ADXS-HPV in patients with metastasized, progressive cervical cancer that have not responded			Advanced carcinoma of the cervix	Completed Phase I	Advaxis Inc.	[48]
Cancer Vaccines CRS-207 and GVAX pancreas for metastatic pancreatic adenocarcinoma	*L. monocytogenes* CRS-207 (iv. route)	ActA-Mesothelin	Metastatic pancreatic adenocarcinoma	CRS-207+GVAX Ongoing Phase II	Aduro Biotech Inc. Johns Hopkins University	[205]
CRS-207 Cancer vaccine in combination with chemotherapy as front-line treatment for malignant pleural mesothelioma			Malignant pleural mesothelioma	Ongoing Phase IB	Aduro Biotech Inc.	[206]

†and Rhode Island Hospital, The Miriam Hospital, Montefiore Medical Center, Montefiore Medical Center, M.D. Anderson Cancer Center, Boston Medical Center, Ohio State University Comprehensive Cancer Center, University of Pennsylvania.
‡Airntree University Hospitals NHS Foundation Trust, Cancer Research UK, Recipharm AB, Advaxis Inc.
5-FU: 5-fluorouracil; LLO: Lysteriolysin; Lm: *L. monocytogenes*; *S. enterica*: *Salmonella enterica*; *S. typhi*: *Salmonella typhi*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*. iv.: Intravenous.

Table 3. Clinical trials with live-attenuated bacterial vectors for cancer immunotherapy (cont.).

Trial Name	Bacterial vector	Antigen	Indication	Trial status	Sponsors/ collaborators	Ref.
Study of safety and tolerability of intravenous CRS-207 in adults with selected advanced solid tumors who have failed or who are not candidates for standard treatment			Advanced solid tumors not candidates for standard treatment	Completed Phase I	Aduro Biotech Inc.	[50]
IL-2 expressing, attenuated *Salmonella typhimurium* in unresectable hepatic spread	*S. enterica* (oral route)	Human IL-2	Unresectable hepatic metastasis from a solid tumor cancer	Ongoing Phase I	Masonic Cancer Center, University of Minnesota	[207]
Not registered in the clinicaltrial.gov database	*S. typhimurium* (intratumoral)	Cytosine deaminase	Head, neck and esophagus cancer	Completed Phase I	Vion Pharmaceuticals, Inc.	[58]
VXM01 Phase I dose escalation study in patients with locally advanced, inoperable and stage iv pancreatic cancer	*S. typhi* strain Ty21a (oral route)	VEGFR-2 DNA	Locally advanced, inoperable and stage IV pancreatic cancer	Ongoing Phase I/II	VAXIMM Inc.	[105]

†and Rhode Island Hospital, The Miriam Hospital, Montefiore Medical Center, Montefiore Medical Center, M.D. Anderson Cancer Center, Boston Medical Center, Ohio State University Comprehensive Cancer Center, University of Pennsylvania.
‡Aintree University Hospitals NHS Foundation Trust, Cancer Research UK, Recipharm AB, Advaxis Inc.
5-FU: 5-fluorouracil; LLO: Lysteriolysin; Lm: *L. monocytogenes*; *S. enterica*: *Salmonella enterica*; *S. typhi*: *Salmonella typhi*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*. iv.: Intravenous.

man study to investigate an oral attenuated *S. typhimurium* vaccine.

Advaxis Inc. has 5 ongoing Phase I/II and Phase II clinical trials with their first-in-class ADXS-HPV (*Lm*-LLO-E7) product, which secretes the HPV-16 E7 antigen fused to a fragment of LLO. Two Phase II studies (India and USA) are currently evaluating its efficacy against advanced cervical cancer in women who have failed cytotoxic therapy, and one is underway to assess its safety and efficacy for the treatment of grade 2/3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) patients. According to the preliminary data reported by the study's sponsor, tumor responses (complete and partial) and early signs of survival benefit were obtained, alone or in association with cytotoxic therapy, in recurrent/refractory cervical cancer. A recent update of the trial, which will be published at the end of 2013, describes promising survival benefits. The previous results of a Phase I trial indicated that the vaccine was well tolerated and yielded a clinical benefit [48].

Since last year, Advaxis Inc. has initiated two new Phase I/II clinical trials. The first will evaluate the safety and disease-free survival of head and neck cancer patients positive for HPV-16, while the more recent study will study the safety and effectiveness of ADXS-HPV when combined with standard chemotherapy and radiation treatment for anal cancer (Table 3).

Aduro Biotech Inc. is conducting clinical trials with CRS-207, a live-attenuated *L. monocytogenes* vaccine expressing mesothelin tumor-associated antigen for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma in combination with the GVAX pancreas vaccine (Phase II) and malignant pleural mesothelioma in combination with chemotherapy (Phase I/II). CRS-207 was previously evaluated in a Phase I study for safety and tolerability in adults with mesothelin-positive advanced solid tumors who failed or who are not candidates for standard treatment [50]. CRS-207 was well-tolerated, and Le *et al.*, also reported evidence of immune activation and induction of tumor-specific immunity, with 37% of end-stage cancer subjects living 15 months or longer.

VAXIMM Inc. recently reported positive safety and tolerability data from its first oral cancer vaccine VXM01 trial in patients with locally advanced and inoperable stage IV pancreatic cancer. Patients received several doses of VXM01, a therapeutic vaccine targeting the tumor vasculature (VEGFR-2), or a placebo in addition to standard treatment. The VXM01 vaccine consists of multiple oral administrations of *S. typhi* strain Ty21a, which contains a plasmid encoding the VEGFR-2 gene. Presumably, the vaccine initiates VEGFR-2 protein expression in monocytes and dendritic cells after the entry of bacteria in the Peyer's patch via the M cells of the gut, where internalization by antigen-presenting cells is followed by translation of the encoded DNA. The preliminary results indicate that the vaccine is safe and well-tolerated even at high doses and, according to the sponsor, specific T-cell responses and changes in tumor vasculature were observed. After multiple vaccinations, even at a low dose, 25% of patients displayed a strongly increased T-cell mediated immune response against VEGFR-2, and a third displayed a strong decrease in tumor perfusion. More detailed results will be published soon.

In (Table 2), we report a Phase I study, completed by VION pharmaceuticals Inc. in the early 2000s, of an attenuated strain of *S. typhimurium* expressing an *E. coli* cytosine deaminase (TAPET-CD or VNP20029), which was injected intratumorally in advanced cancer patients. When expressed in the tumor, cytosine deaminase can convert administered 5-fluorocytosine (5-FC) to the active molecule 5-fluorouracil (5-FU). TAPET-CD has been investigated successfully in a Phase I clinical trial, but VION pharmaceuticals was dissolved in 2010 [58].

The last referenced Phase I study was initiated in 2010 by the Masonic Cancer Center and the University of Minnesota using an orally administered attenuated *S. enterica typhimurium* strain expressing IL-2 for unresectable hepatic metastasis from solid tumor cancer. The sponsor provided no data but the NIH Office of Biotechnology Activities reported an adverse event in September 2012. Ten days after receiving the orally administered gene transfer agent, a subject was admitted for gastrointestinal bleeding.

Expert commentary

Cancer therapeutic vaccines can be classified into two types. One involves *ex vivo* antigen loading on APCs and is well represented by the sipuleucel-T prostate cancer vaccine. The other involves engineered vectors for direct antigen delivery and an *in vivo* vaccination process. The simplest way to deliver antigens is to use DNA or modified antigenic proteins. This method likely suffers from weak immunogenicity, although many strategies to enhance the efficacy of these vectors are under investigation, such as adjunction of immunostimulatory TLR agonists. Another method is to use live/attenuated microorganisms, which combines antigen delivery with a strong immune stimulation. Virus- or bacteria-based vectors are now in competition to achieve this ultimate goal. In-depth knowledge of the mechanisms by which bacteria interact with their natural hosts to regulate innate or acquired immune responses, along with a firm understanding of bacterial engineering, enables the development of potential innovative therapeutic vaccinations using live bacteria. Compared to viral or DNA based vectors, bacterial vectors may suffer from difficulty to express large mammalian protein antigens or antigens with post-translational modifications. On the contrary advantages of bacterial vectors over viral vectors are the ease of manufacture and the ability to re-administer to patient without the limitation of pre-existing neutralizing humoral immunity. Nevertheless, the live bacterial vaccine field is in its infancy compared to the large- or medium-sized pharma involved in DNA, protein or viral vaccine development, and the near

future will yield results from the current bacterial vaccine clinical trials. At the industrial level, two bacterial species are currently under consideration for vaccine development. The most advanced is *L. monocytogenes*, which has a natural intracellular infection cycle. The T3SS syringe of *P. aeruginosa* or *Salmonella* spp. allows direct injection of antigenic proteins inside APCs and is promising in this race. The key points that could distinguish these two different means of antigen delivery are the kinetics of antigen delivery, the cytotoxicity of bacteria toward APCs and the quality and intensity of the CD4 response associated to the CD8 response.

Researchers involved in bacterial vaccine development must strike a balance between designing the simplest (hence more robust) bacterial vectors and utilizing more finely tuned engineered tools to address challenges such as stability, toxicity, environmental dissemination and efficiency.

Five-year view

A large number of clinical trials involving *Listeria*-based bacterial vaccines for the treatment of cancer are underway by Aduro Biotech Inc. and Advaxis Inc. Analyzing scientific publications from academic scientists in this field indicates that the enhancement of live bacteria through complex engineering or synthetic biology tools is progressing [59]. Some of the academically developed bacterial therapy machines will soon reach the industrial and clinical trial stage, beginning a new era in the existing field.

The combination of a simple bacterial vaccination with other immune stimulation strategies is also under investigation. As a recent example, we can cite Aduro BioTech Inc., which has announced collaboration with the Johns Hopkins Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center to evaluate the therapeutic approach of anti-PD-1 in combination with one or both of Aduro's vaccine technologies based on live-attenuated *L. monocytogenes*.

Enhancement of efficacy could also result from vaccination scheme optimization, as demonstrated in preclinical studies of *P. aeruginosa* T3SS-mediated antigen delivery by Wang *et al.*, which demonstrated that CD8 immune responses could be improved by providing multiple injections at short intervals. Currently, the greater difficulty is regulatory agencies acceptance of Phase I studies using these approaches.

Finally, some of the bacterial vaccines that are in development involve pathologies that are also targeted by other types of vectors such as viral or DNA vectors, which is the case for the HPV E7 antigen. Increasing amounts of data will be generated in coming years, which will allow the comparison of different vectors in the same types of patients. Thus, comparative data, in terms of efficacy and safety, will soon provide the answer to the fundamental question: which approach is the best for patients?

Financial & competing interests disclosure

A Le Gouëllec, B Toussaint, B Polack are all co-funders of APCure. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Live-attenuated bacterial strains have long been used for prophylactic vaccines, and firms have expertise in preparing and formulating these vaccines. Moreover, easy manufacturing makes these organisms attractive vaccine vectors.
- Several pathogen-based active immunotherapies for the treatment of cancer are currently in preclinical and clinical development, such as the use of *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes*, each of which has different modes of action.
- To stimulate an immune response, a tumor-associated antigen has to be delivered into an APC in the vaccinated host. Several techniques have been investigated in relation to bacterial pathophysiology, such as intracellular delivery via *Listeria* and *S. typhimurium* and protein-injection via the T3SSs of *Pseudomonas* and *Salmonella* spp.
- Concomitant delivery of the antigen with the pathogen danger signal leads to the overall stimulation of the immune system and better long-term protection due to correlation of the microbial threat with the inflammatory response.
- The toxicity of these vectors was problematic until the molecular determinants of toxicity were discovered based on improved knowledge of microbial genetics. However, synthetic biology studies are also needed.
- Bacterial vectors allow the delivery of complex antigens that can be optimized to stimulate both CD8 and CD4 T cells to obtain a long-term effector response while diminishing suppressor responses.
- Numerous clinical trials are currently underway, mainly by three firms: Advaxis Inc., Aduro BioTech Inc. and VAXIMM.
- Live-attenuated bacterial-based vaccines can be used in combination with current chemo-and radio-therapies or immune modulators (e.g., anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4).

References

Papers of special note have been highlighted as:
• of interest
•• of considerable interest

1 Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Am. J. Med. Sci.* (105), 488–511 (1893).

2 Paterson Y, Guirnalda PD, Wood LM. Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.* 22(3), 183–189 (2010).

3 Rothman J, Paterson Y. Live-attenuated Listeria-based immunotherapy. *Expert. Rev. Vaccines* 12(5), 493–504 (2013).

4 Carleton HA. Pathogenic bacteria as vaccine vectors: teaching old bugs new tricks. *Yale J. Biol. Med.* 83(4), 217–222 (2010).

5 Spreng S, Viret JF. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine* 23(17–18), 2060–2065 (2005).

6 Singh R, Wallecha A. Cancer immunotherapy using recombinant Listeria monocytogenes: Transition from bench to clinic. *Hum. Vaccin.* 7(5) (2011).

7 Wallecha A, Maciag PC, Rivera S, Paterson Y, Shahabi V. Construction and characterization of an attenuated Listeria monocytogenes strain for clinical use in cancer immunotherapy. *Clin. Vaccine Immunol.* 16(1), 96–103 (2009).

8 Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by Listeria monocytogenes: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell. Biol.* 13(1), 23–31 (2003).

9 Southwick FS, Purich DL. Listeria and Shigella actin-based motility in host cells. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 109, 160–172; discussion 172–163 (1998).

10 Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. *J. Cell Biol.* 109(4 Pt 1), 1597–1608 (1989).

11 Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* 179(2), 601–608 (1994).

12 Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444(7119), 567–573 (2006).

13 Russmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galan JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* 281(5376), 565–568 (1998).

•• **First article describing the type III secretion system of *Salmonella* as efficient tool to deliver heterologous antigenic protein inside host cells and to induce class I-restricted immune responses.**

14 Chamekh M. Immunomodulation using genetically engineered bacteria for type III-mediated delivery of heterologous antigens and cytokines: potential application in vaccine and therapeutical developments. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32(1), 1–4 (2012).

15 Hegazy WA, Xu X, Metelitsa L, Hensel M. Evaluation of Salmonella enterica type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. *Infect. Immun.* 80(3), 1193–1202 (2012).

16 Le Gouellec A, Chauchet X, Laurin D *et al.* A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. *Mol. Ther.* 21(5), 1076–1086 (2013).

17 Le Gouellec A, Chauchet X, Polack B, Buffat L, Toussaint B. Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. *Hum. Vaccines Immunother.* 8(10), 1454–1458 (2012).

18 Panthel K, Meinel KM, Sevil Domenech VE *et al.* Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system. *Microbes Infect.* 8(9–10), 2539–2546 (2006).

• **First published article on type III secretion system of *Salmonella* used to deliver antigen for prevention of tumor growth.**

19 Schafer R, Portnoy DA, Brassell SA, Paterson Y. Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant Listeria monocytogenes vaccine. *J. Immunol.* 149(1), 53–59 (1992).

• **Early paper on *Listeria monocytogenes* produced as antigen delivery vector for cancer immunotherapy.**

20 Gentschev I, Dietrich G, Spreng S *et al.* Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 291(6–7), 577–582 (2002).

21 Paterson Y, Johnson RS. Progress towards the use of Listeria monocytogenes as a live bacterial vaccine vector for the delivery of HIV antigens. *Expert Rev Vaccines* 3(4 Suppl.), S119–S134 (2004).

22 Singh R, Paterson Y. Listeria monocytogenes as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Expert Rev. Vaccines* 5(4), 541–552 (2006).

23 Galen JE, Pasetti MF, Tennant S, Ruiz-Olvera P, Sztein MB, Levine MM. Salmonella enterica serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol. Cell. Biol.* 87(5), 400–412 (2009).

24 Gentschev I, Dietrich G, Spreng S *et al.* Use of the alpha-hemolysin secretion system of Escherichia coli for antigen delivery in the Salmonella typhi Ty21a vaccine strain. *Int. J.Med Microbiol.* 294(6), 363–371 (2004).

25 Fensterle J, Bergmann B, Yone CL *et al.* Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer Gene Ther*, 15(2), 85–93 (2008).

26 Chen LM, Briones G, Donis RO, Galan JE . Optimization of the delivery of heterologous proteins by the Salmonella enterica serovar Typhimurium type III secretion system for vaccine development. *Infect. Immun.* 74(10), 5826–5833 (2006).

27 Chen G, Dai Y, Chen J *et al.* Oral delivery of the Sj23LHD-GST antigen by Salmonella typhimurium type III secretion system protects against Schistosoma japonicum infection in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(9), e1313 (2011).

28 Juarez-Rodriguez MD, Arteaga-Cortes LT, Kader R, Curtiss R 3rd, Clark-Curtiss JE. Live Attenuated Salmonella Vaccines against Mycobacterium tuberculosis with Antigen Delivery via the Type III Secretion System. *Infect. Immun.* 80(2), 798–814 (2012).

29 Panthel K, Meinel KM, Domenech VE *et al.* Salmonella pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. *Infect. Immun.* 73(1), 334–341 (2005).

30 Husseiny MI, Wartha F, Hensel M. Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of Salmonella Pathogenicity Island 2. *Vaccine* 25(1), 185–193 (2007).

31 Xiong G, Husseiny MI, Song L *et al.* Novel cancer vaccine based on genes of Salmonella pathogenicity island 2. *Int. J. Cancer* 126(11), 2622–2634 (2010).

32 Toso JF, Gill VJ, Hwu P *et al.* Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 20(1), 142–152 (2002).

33 Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N *et al.* Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* 10(10), 737–744 (2003).

34 Epaulard O, Toussaint B, Quenee L *et al.* Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. *Mol. Ther.* 14(5), 656–661 (2006).

• **First paper on *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system demonstrated as molecular syringe to deliver antigen and induce protective cellular immunity.**

35 Derouazi M, Wang Y, Marlu R *et al.* Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector Application to TRP-2. *Bioeng. Bugs* 1(1), 51–60 (2010).

36 Wang Y, Gouellec AL, Chaker H, Asrih H, Polack B, Toussaint B. Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J. Immunother.* 35(3), 223–234 (2012).

37 Pilgrim S, Stritzker J, Schoen C *et al.* Bactofection of mammalian cells by Listeria monocytogenes: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther.* 10(24), 2036–2045 (2003).

38 Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int. J. Med. Microbiol.* 294(5), 319–335 (2004).

39 Souders NC, Verch T, Paterson Y. In vivo bactofection: listeria can function as a DNA-cancer vaccine. *DNA Cell. Biol.* 25(3), 142–151 (2006).

40 Schoen C, Loeffler DI, Frentzen A, Pilgrim S, Goebel W, Stritzker J. Listeria monocytogenes as novel carrier system for the development of live vaccines. *Int. J. Med Microbiol.* 298(1–2), 45–58 (2008).

41 Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat. Rev. Immunol.* 12(3), 215–225 (2012).

42 Germanier R, Fuer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 131(5), 553–558 (1975).

43 Epaulard O, Derouazi M, Margerit C *et al.* Optimization of a type III secretion system-based Pseudomonas aeruginosa live vector for antigen delivery. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(2), 308–313 (2008).

44 Stocker BA. Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine. *Vaccine* 6(2), 141–145 (1988).

45 Pasetti MF, Levine MM, Sztein MB. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated Salmonella enterica serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine* 21(5–6), 401–418 (2003).

46 Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. *Methods* 38(2), 133–143 (2006).

47 Brockstedt DG, Dubensky TW. Promises and challenges for the development of Listeria monocytogenes-based immunotherapies. *Expert Rev. Vaccines* 7(7), 1069–1084 (2008).

48 Maciag PC, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated Listeria monocytogenes vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 27(30), 3975–3983 (2009).

49 Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML *et al.* Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(38), 13832–13837 (2004).

50 Le DT, Brockstedt DG, Nir-Paz R *et al.* A live-attenuated Listeria vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated Listeria vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin. Cancer Res.* 18(3), 858–868 (2012).

51 Hauser AR. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(9), 654–665 (2009).

52 Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 67(11), 6164–6167 (1999).

53 Dubensky TW Jr, Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. *Curr Opin Biotechnol.* 23(6), 917–23. (2012).

• **A full review on Killed but metabolically active pathogen used for cancer vaccine.**

54 Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA *et al.* Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat. Med.* 11(8), 853–860 (2005).

•• **First demonstration of the benefit to use killed but metabolically active *Listeria monocytogenes* for eliciting effector T-cell response and protective immunity.**

55 Sauer JD, Pereyre S, Archer KA *et al.* Listeria monocytogenes engineered to activate the Nlrc4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(30), 12419–12424 (2011).

56 Polack B, Vergnaud S, Paclet MH, Lamotte D, Toussaint B, Morel F. Protein delivery by Pseudomonas type III secretion system: Ex vivo complementation of p67 (phox)-deficient chronic granulomatous disease. *Biochem Biophy. Res. Comm.* 275(3), 854–858 (2000).

57 Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482(7385), 400–404 (2012).

58 King I, Itterson M, Bermudes D. Tumor-targeted Salmonella typhimurium overexpressing cytosine deaminase: a novel, tumor-selective therapy. *Methods Mol. Biol.* 542, 649–659 (2009).

59 Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 10(11), 785–794 (2010).

60 Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J. Immunol.* 167(11), 6471–6479 (2001).

61 Dominiecki ME, Beatty GL, Pan ZK, Neeson P, Paterson Y. Tumor sensitivity to IFN-gamma is required for successful antigen-specific immunotherapy of a transplantable mouse tumor model for HPV-transformed tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 54(5), 477–488 (2005).

62 Souders NC, Sewell DA, Pan ZK *et al.* Listeria-based vaccines can overcome tolerance by expanding low avidity CD8+ T cells capable of eradicating a solid tumor in a transgenic mouse model of cancer. *Cancer Immun.* 7, 2 (2007).

63 Sewell DA, Douven D, Pan ZK, Rodriguez A, Paterson Y. Regression of HPV-positive tumors treated with a new Listeria monocytogenes vaccine. *Arch.*

Otolaryngol. Head Neck Surg. 130(1), 92–97 (2004).

64 Sewell DA, Shahabi V, Gunn GR 3rd, Pan ZK, Dominiecki ME, Paterson Y. Recombinant Listeria vaccines containing PEST sequences are potent immune adjuvants for the tumor-associated antigen human papillomavirus-16 E7. *Cancer Res.* 64(24), 8821–8825 (2004).

65 Lin CW, Lee JY, Tsao YP, Shen CP, Lai HC, Chen SL. Oral vaccination with recombinant Listeria monocytogenes expressing human papillomavirus type 16 E7 can cause tumor growth in mice to regress. *Int. J. Cancer* 102(6), 629–637 (2002).

66 Verch T, Pan ZK, Paterson Y. Listeria monocytogenes-based antibiotic resistance gene-free antigen delivery system applicable to other bacterial vectors and DNA vaccines. *Infect. Immun.* 72(11), 6418–6425 (2004).

67 Jia Y, Yin Y, Duan F *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacy of an attenuated Listeria monocytogenes-based vaccine delivering HPV16 E7 in a mouse model. *Int. J. Mol. Med.* 30(6), 1335–1342 (2012).

68 Mustafa W, Maciag PC, Pan ZK *et al.* Listeria monocytogenes delivery of HPV-16 major capsid protein L1 induces systemic and mucosal cell-mediated CD4+ and CD8+ T-cell responses after oral immunization. *Viral Immunol.* 22(3), 195–204 (2009).

69 Singh R, Dominiecki ME, Jaffee EM, Paterson Y. Fusion to Listeriolysin O and delivery by Listeria monocytogenes enhances the immunogenicity of HER-2/neu and reveals subdominant epitopes in the FVB/N mouse. *J. Immunol.* 175(6), 3663–3673 (2005).

70 Singh R, Paterson Y. In the FVB/N HER-2/neu transgenic mouse both peripheral and central tolerance limit the immune response targeting HER-2/neu induced by Listeria monocytogenes-based vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.* 56(6), 927–938 (2007).

71 Seavey MM, Pan ZK, Maciag PC *et al.* A novel human Her-2/neu chimeric molecule expressed by Listeria monocytogenes can elicit potent HLA-A2 restricted CD8-positive T cell responses and impact the growth and spread of Her-2/neu-positive breast tumors. *Clin. Cancer Res.* 15(3), 924–932 (2009).

72 Shahabi V, Seavey MM, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Development of a live and highly attenuated Listeria monocytogenes-based vaccine for the treatment of Her2/neu-overexpressing cancers in human. *Cancer Gene Ther.* 18(1), 53–62 (2011).

73 Wood LM, Pan ZK, Guirnalda P, Tsai P, Seavey M, Paterson Y. Targeting tumor vasculature with novel Listeria-based vaccines directed against CD105. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(7), 931–942 (2011).

74 Kim SH, Castro F, Gonzalez D, Maciag PC, Paterson Y, Gravekamp C. Mage-b vaccine delivered by recombinant Listeria monocytogenes is highly effective against breast cancer metastases. *Br. J. Cancer* 99(5), 741–749 (2008).

75 Wood LM, Pan ZK, Seavey MM, Muthukumaran G, Paterson Y. The ubiquitin-like protein, ISG15, is a novel tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 61(5), 689–700 (2012).

76 Jensen ER, Selvakumar R, Shen H, Ahmed R, Wettstein FO, Miller JF. Recombinant Listeria monocytogenes vaccination eliminates papillomavirus-induced tumors and prevents papilloma formation from viral DNA. *J. Virol.* 71(11), 8467–8474 (1997).

77 Maciag PC, Seavey MM, Pan ZK, Ferrone S, Paterson Y. Cancer immunotherapy targeting the high molecular weight melanoma-associated antigen protein results in a broad antitumor response and reduction of pericytes in the tumor vasculature. *Cancer Res.* 68(19), 8066–8075 (2008).

78 Bruhn KW, Craft N, Nguyen BD, Yip J, Miller JF. Characterization of anti-self CD8 T-cell responses stimulated by recombinant Listeria monocytogenes expressing the melanoma antigen TRP-2. *Vaccine* 23(33), 4263–4272 (2005).

79 Shahabi V, Reyes-Reyes M, Wallecha A, Rivera S, Paterson Y, Maciag P. Development of a Listeria monocytogenes based vaccine against prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 57(9), 1301–1313 (2008).

80 Hannan R, Zhang H, Wallecha A *et al.* Combined immunotherapy with Listeria monocytogenes-based PSA vaccine and radiation therapy leads to a therapeutic response in a murine model of prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 61(12), 2227–2238 (2012).

81 Zhu X, Zhou P, Cai J, Yang G, Liang S, Ren D. Tumor antigen delivered by Salmonella III secretion protein fused with heat shock protein 70 induces protection and eradication against murine melanoma. *Cancer Sci.* 101(12), 2621–2628 (2010).

82 Jellbauer S, Panthel K, Hetrodt JH, Russmann H. CD8 T-cell induction against vascular endothelial growth factor receptor 2 by Salmonella for vaccination purposes against a murine melanoma. *PLoS One* 7(4), e34214 (2012).

83 Wang YJ, Hou Y, Huang H, Liu GR, White AP, Liu SL. Two oral HBx vaccines delivered by live attenuated Salmonella: both eliciting effective anti-tumor immunity. *Cancer Lett.* 263(1), 67–76 (2008).

84 Roider E, Jellbauer S, Kohn B *et al.* Invasion and destruction of a murine fibrosarcoma by Salmonella-induced effector CD8 T cells as a therapeutic intervention against cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(3), 371–380 (2011).

85 Nishikawa H, Sato E, Briones G *et al.* In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* 116(7), 1946–1954 (2006).

86 Hummel S, Apte RN, Qimron U, Vitacolonna M, Porgador A, Zoller M. Tumor vaccination by Salmonella typhimurium after transformation with a eukaryotic expression vector in mice: impact of a Salmonella typhimurium gene interfering with MHC class I presentation. *J. Immunother.* 28(5), 467–479 (2005).

87 Lu XL, Jiang XB, Liu RE, Zhang SM. The enhanced anti-angiogenic and antitumor effects of combining flk1-based DNA vaccine and IP-10. *Vaccine* 26(42), 5352–5357 (2008).

88 Fu W, Chu L, Han X, Liu X, Ren D. Synergistic antitumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium in murine tumor models. *J. Gene Med.* 10(6), 690–701 (2008).

89 Niethammer AG, Xiang R, Ruehlmann JM *et al.* Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma. *Cancer Res.* 61(16), 6178–6184 (2001).

90 Xiang R, Lode HN, Chao TH *et al.* An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(10), 5492–5497 (2000).

91 Qian BJ, Yan F, Li N *et al.* MTDH/AEG-1-based DNA vaccine suppresses lung metastasis and enhances chemosensitivity to

doxorubicin in breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(6), 883–893 (2011).

92 Lee SH, Mizutani N, Mizutani M *et al.* Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 55(12), 1565–1574 (2006).

93 Lewen S, Zhou H, Hu HD *et al.* A Legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses breast cancer growth and angiogenesis. *Cancer Immunol. Immunother.* 57(4), 507–515 (2008).

94 Luo Y, O'Hagan D, Zhou H *et al.* Plasmid DNA encoding human carcinoembryonic antigen (CEA) adsorbed onto cationic microparticles induces protective immunity against colon cancer in CEA-transgenic mice. *Vaccine* 21(17–18), 1938–1947 (2003).

95 Zuo SG, Chen Y, Wu ZP *et al.* Orally administered DNA vaccine delivery by attenuated Salmonella typhimurium targeting fetal liver kinase 1 inhibits murine Lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Biol. Pharm. Bull.* 33(2), 174–182 (2010).

96 Niethammer AG, Primus FJ, Xiang R *et al.* An oral DNA vaccine against human carcinoembryonic antigen (CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice. *Vaccine* 20(3–4), 421–429 (2001).

97 Dong J, Yang J, Chen MQ *et al.* A comparative study of gene vaccines encoding different extracellular domains of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in the mouse model of colon adenocarcinoma CT-26. *Cancer Biol Ther.* 7(4), 502–509 (2008).

98 Xiang R, Silletti S, Lode HN *et al.* Protective immunity against human carcinoembryonic antigen (CEA) induced by an oral DNA vaccine in CEA-transgenic mice. *Clin. Cancer Res.* 7(3 Suppl.), 856s–864s (2001).

99 Zhou H, Luo Y, Mizutani M *et al.* A novel transgenic mouse model for immunological evaluation of carcinoembryonic antigen-based DNA minigene vaccines. *J. Clin. Invest.* 113(12), 1792–1798 (2004).

100 Fest S, Huebener N, Bleeke M *et al.* Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma. *Int. J. Cancer* 125(1), 104–114 (2009).

101 Huebener N, Fest S, Strandsby A *et al.* A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity. *Mol. Cancer Ther.* 7(7), 2241–2251 (2008).

102 Feng KK, Zhao HY, Qiu H, Chen J. [Specific anti-glioma angiogenesis immune response induced by attenuated Salmonella typhimurium vaccine expressing vascular endothelial growth factor receptor-2]. *Ai. Zheng.* 24(5), 548–553 (2005).

103 Ahmad S, Casey G, Cronin M *et al.* Induction of effective antitumor response after mucosal bacterial vector mediated DNA vaccination with endogenous prostate cancer specific antigen. *J. Urol.* 186(2), 687–693 (2011).

104 Guo CC, Ding J, Pan BR *et al.* Development of an oral DNA vaccine against MG7-Ag of gastric cancer using attenuated salmonella typhimurium as carrier. *World J. Gastroenterol.* 9(6), 1191–1195 (2003).

105 Niethammer AG, Lubenau H, Mikus G *et al.* Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* 12, 361 (2012).

Websites

201 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01266460. Vaccine Therapy in Treating Patients With Persistent or Recurrent Cervical Cancer. http://clinicaltrials.gov/show/NCT01266460

202 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01116245. An Assessment of an Attenuated Live Listeria Vaccine in CIN 2+ (ADXS11-001). http://clinicaltrials.gov/show/NCT01116245

203 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01671488. A Phase I/II Evaluation of ADXS11-001, Mitomycin, 5-fluorouracil (5-FU) and IMRT for Anal Cancer (276). http://clinicaltrials.gov/show/NCT01671488

204 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01598792. Safety Study of Recombinant Listeria Monocytogenes(Lm)Based Vaccine Virus Vaccine to Treat Oropharyngeal Cancer (REALISTIC). http://clinicaltrials.gov/show/NCT01598792

205 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01417000. Cancer Vaccines CRS-207 and GVAX Pancreas for Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. http://clinicaltrials.gov/show/NCT01417000

206 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01675765. CRS-207 Cancer Vaccine in Combination With Chemotherapy as Front-line Treatment for Malignant Pleural Mesothelioma. http://clinicaltrials.gov/show/NCT01675765

207 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01099631. IL-2 Expressing, Attenuated Salmonella Typhimurium in Unresectable Hepatic Spread. http://clinicaltrials.gov/show/NCT01099631

Human Vaccines & Immunotherapeutics 8:10, 1454-1458; October 2012; © 2012 Landes Bioscience

Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages

Audrey Le Gouëllec,[1] Xavier Chauchet,[1] Benoit Polack,[1] Laurent Buffat[2] and Bertrand Toussaint[1,*]
[1]Faculté de Médecine; Université Joseph Fourier; Grenoble, France; [2]APCure SAS; Lyon, France

Active immunotherapy based on live attenuated bacterial vectors has matured in terms of industrial development and develops through a combination of three phenomena. First, active immunotherapy that stimulates an antigen-specific cytotoxic T-cell immune response has become a reality after several years of work. Second, there is still a need to identify vectors that can deliver antigens to the cytosol of antigen-presenting cells in vivo. Third, the recent progress in the understanding of bacterial lifestyle and in developing genetic engineering tools has enabled the design of bioengineered bugs that are capable of delivering antigens. Here, we review the mechanisms by which clinical bacterial vectors deliver antigens into the cytosol of antigen-presenting cells and summarize the development strategy of the three identified firms in this field.

Keywords: immunotherapy, antigen delivery, bacteria, attenuation, Listeria, Pseudomonas

Submitted: 07/02/12

Accepted: 07/10/12

http://dx.doi.org/10.4161/hv.21429

*Correspondence to: Bertrand Toussaint; Email: btoussaint@chu-grenoble.fr

Why Have Bacterial Vectors Reached the Clinical and Industrial Stage?

Active cellular immunotherapy is emerging. Advances in basic immunology have led to an improved understanding of the interactions between the immune system, tumors and pathogens. To re-engage the immune system in its fight against "bad" cells, active immunotherapy focuses on the development of agents that activate the immune system to target and kill these cells. Strategies to stimulate effector immune cells include ex vivo or in vivo vaccination with specific antigens, treatment with cytokines (e.g., IL-2), enhancement of antigen presentation (by stimulation of toll-like receptors (TLRs), administration of dendritic cells (DCs) or the use of CD40-targeted agonistic antibodies) and blocking inhibitory signals (antibodies against CTLA4). At the moment, more than 200 active therapeutic vaccine trials across a wide spectrum of cancers and infectious diseases are listed at ClinicalTrials.gov. The first active immunotherapeutic approach that reached the market, in 2010, was Sipuleucel-T (Provenge, Dendreon), which consists of autologous peripheral blood mononuclear cells loaded ex vivo with a fusion protein of prostatic acid phosphatase (PAP) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to treat patients with advanced prostate cancer.

Need for in vivo antigen delivery. Among the different strategies to stimulate the antigen-specific T-cell response, the ex vivo loading of DCs (as in Provenge's strategy) appears to be too difficult to generalize because of logistical problems. Rather, many firms have conducted clinical trials using in vivo strategies based on the development of vectors that deliver antigens or nucleic acids encoding antigens to the cytosol of antigen-presenting cells (APCs). These vectors include viruses, virus-like particles, plasmid DNA, peptides, chimeric proteins and bacteria.[1]

Bacterial lifestyles have become better understood, and molecular engineering has assisted in the development of bacterial vaccines. "Killed" or attenuated bacteria have long been used for prophylactic vaccines. Hence, extensive clinical data are available, and firms have expertise in preparing and formulating this kind of vaccine. Microbial pathogens were the

earliest non-surgical cancer treatment. In the nineteenth century, William Coley developed the first bacterial-based cancer treatment, which was composed of killed gram-positive streptococci and gram-negative *Serratia marcescens* injected directly into the tumor.[2] However, safety concerns and the advent of radiotherapy and chemotherapy treatments led to a decline in the use of this treatment. Nevertheless, live Bacillus Calmette-Guerin (BCG) is still in clinical use for bladder cancer treatment. In this kind of bacteria-mediated cancer immunotherapy, many of the antitumor effects induced by bacteria are nonspecific, including angiostatic effects induced by pro-inflammatory cytokines, such as IL-12 and IFN-gamma, direct tumor necrosis by tumor necrosis factor (TNF) α, induction of epitope spreading induced by the death of tumor cells from these indirect mechanisms and the direct killing of tumor cells infected by bacteria. An important molecular component of DCs that can be targeted for immunotherapy is the TLR, which recognizes microbes. Indeed, the activation of DCs is likely to contribute to therapeutic effects that are associated with the nonspecific activation of anti-tumor immunity by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and several TLR ligands are currently being tested in clinical trials.[3]

Bacteria can also mediate antigen-specific responses if they are engineered to express and deliver antigens to the correct compartment, i.e. the cytosol of APCs, during the vaccination process which became, in this case, a controlled infection. The understanding of the molecular mechanisms whereby DCs augment the stimulation of naive T-cells is rapidly growing. Nevertheless, host perception of the level of danger linked to this infection directly influences the type and intensity of the immune response.[4] Because the challenge of $CD8^+$ T-cell-mediated immunotherapy is to overcome tolerogenic events (the majority of tumor antigens bear strong similarity to self-proteins), bacterial vectors have the advantage of delivering both an antigenic message and a strong danger signal mediated by their PAMPs. PAMPs, such as lipopolysaccharide, lipoproteins, flagellin and DNA containing unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG), can bind to their respective TLRs on APCs, such as DCs, leading to upregulation of co-stimulatory molecules, the maturation and migration of APCs to secondary lymph nodes and the production of pro-inflammatory cytokines.

Over the past 40 years, advances in bacterial engineering, molecular biology and our understanding of pathogenic bacterial lifestyles have significantly accelerated the rational design of bacterial vectors that induce the in vivo delivery of heterologous antigens inside APCs. Bacterial vaccine vectors offer multiple advantages: (1) there are several well-characterized virulence-attenuating mutations; (2) the number, the amount and the in vivo location of antigen expression can be regulated; (3) multiple vaccine delivery routes are possible; and (4) they potently stimulate the innate and adaptive immune systems.

How to Deliver an Antigen Inside APCs by Means of a Bacterium in Vivo?

Currently, two major engineered but natural processes are being explored at preclinical or clinical stages to achieve the delivery of antigenic proteins inside APCs. The first is based on the use of the type III secretion system to deliver bacterial toxins to a cell's cytoplasm. The second uses pathogens with natural intracellular tropism. At the industrial development stage, the first strategy uses primarily Salmonella sp or *P. aeruginosa*, and the second uses *Listeria monocytogenes*.

Type III-mediated delivery. The type III secretion system (T3SS) is a critical virulence factor used by a broad range of pathogens (e.g., Salmonella, Shigella, Yersinia and Pseudomonas) to deliver toxins into the cytoplasm of host cells. Toxins are addressed to the T3SS thanks to a sort signaling sequence and when fusing an antigen of interest to this short sequence, recombinant protein can be engaged by the T3SS and delivered to the cytosol of DCs, which are often targeted by pathogens to disrupt the immune response and favor natural infection. Therefore, this strategy is an effective way to deliver antigens directly inside APCs.[5-9]

Intracellular microbes bearing antigens. *L. monocytogenes* is a facultative, intracellular, gram-positive rod that invades the intestinal mucosa and is captured by phagocytes. Listeria can modify phagosomes into large compartments termed spacious Listeria-associated phagosomes (SLAPS). Listeria secretes listeriolysin O (LLO) and phospholipase C, which induces the degradation of the phagolysosome membrane and the release of 5–10% of the bacteria into the cytoplasm, where they multiply and become motile via the expression of ActA, an actin polymerase that enables actin mobilization. The use of live recombinant strains of *L. monocytogenes* to deliver antigens began with the pioneering work of Dr Yvonne Paterson in Pennsylvania. Her work demonstrated that a recombinant *L. monocytogenes* that expressed and secreted the model antigen influenza virus nucleoprotein (NP) fused to LLO could efficiently infect APCs, and this expressed NP protein was processed by the endogenous antigen-processing pathway, facilitating the presentation of NP epitopes in the context of MHC class I molecules.[10] Since then, the *L. monocytogenes* platform has rapidly evolved to become one of the most efficacious approaches for antigen delivery for infectious diseases[11] and cancer (For a review see.[12])

Salmonella is a gram-negative bacterium and intracellular pathogen that causes salmonellosis. Its intracellular survival and replication are restricted to the endosomal compartment of eukaryotic cells, such as macrophages. Several publications have illustrated the use of live attenuated Salmonella strains to elicit mucosal and systemic immune responses against antigens from other infectious bacteria, viruses, tumor antigens or tumor-promoting growth factors.[13] Despite the numerous preclinical studies using salmonella strains, few have advanced to human clinical trials, and no clinical efficacy has been reported.

How to Transform a Pathogen into an Innovative Therapeutic Product?

Strategies for attenuating bacterial virulence. According to the

"patho-biotechnology" approach,[14] live strains of bacteria have to be engineered to significantly improve their clinical effectiveness (safety and efficacy) and technological robustness. The primary goal is to develop bacterial strains that retain their capacity to synthesize/deliver antigens and induce robust immune responses against antigens but exhibit reduced pathogenicity.

In this context, two main strategies have been explored: live attenuated bacteria and killed but metabolically active (KBMA) bacteria.

Live attenuated vaccines. Over the past few decades, advances in bacterial genetics combined with the emergence of improved molecular biology tools have allowed the dissection of the mechanisms of bacterial virulence and have specified the complexity of host-pathogen interactions.[15]

The use of well-defined, non-reverting attenuating deletions allows for the development of live attenuated bacteria with no risk of reversion to a virulent state. To date, few strains of attenuated live bacteria vaccines have proven acceptable for human use in preventing infectious diseases. Attenuation is primarily based on the deletion of genes involved in particular metabolic pathways or critical virulence factors. One of the best-characterized attenuations in a metabolic pathway is the deletion of the *aroA* gene, which encodes 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, an enzyme that is involved in aromatic amino acid synthesis. This attenuation renders Salmonella, Listeria and Pseudomonas species auxotrophic for aromatic amino acids, lowering their capacity for in vivo replication and eliminating their pathogenicity.[6,16]

Multiple virulence-attenuated vaccine vectors have also been developed. For example, in Salmonella, the most widely studied strains have mutations in the *phoP/phoQ* regulator system or in Salmonella pathogenicity island 2 (SPI2). Salmonella virulence factors encoded in the *phoP* locus induce the formation of spacious vacuoles from phagosomes, which allows bacterial persistence and growth in these organelles. The most commonly used deletions to decrease the virulence of Listeria vectors are the *actA* deletion, which blocks its ability to spread from cell to cell, thus limiting bacterial dissemination, and the *inlB* deletion, which blocks the direct uptake of Listeria by hepatocytes, thus minimizing its potential to cause liver-related toxicity.[17]

It is important to maintain a subtle balance between minimal pathogenicity and maximal immunogenicity with live bacterial vectors because attenuation procedures could impact the course of infection and hence the immune response. For example, oral administration of a PhoP-null Salmonella mutant induces the innate immune response, whereas an *aroA* mutant elicits a stronger TH1-like T-cell response.[18] However, an engineered strain of *L. monocytogenes* that enhances the NLRC4 inflammasome is too attenuated and fails to induce protective immunity based on antigen-specific $CD8^+$ T-cells.[19] To counteract the poor infectivity linked to attenuation, Wang et al. have demonstrated that satisfactory T-cell immune responses with an *aroA*-attenuated *P. aeruginosa* vector could be restored by mimicking the intrabody dissemination using multiple loci injections.[20]

Killed but metabolically active vaccine. The killed but metabolically active (KBMA) approach recently reviewed,[21] is based on the Intercept Blood system® developed by Cerus Corporation (Concord, CA) to inactivate undetected microbes contaminating plasma and platelet blood products.[22] Briefly, it consists of a combination of a synthetic psoralen (amotosalen hydrochloride, S59) and illumination with long-wave UV (UVA) light, which induces covalent monoadducts and crosslinks of DNA and RNA. Brockstedt et al. used this technology and envisioned "a new vaccine paradigm" in which they combined the safety of a killed vaccine with the potency of a live vaccine. To obtain such a result, they removed genes required for nucleotide excision repair (*uvrAB*), which is the primary mechanism by which bacteria repair psoralen-induced crosslinks. Accordingly, these gene deletions render microbial-based vaccines more sensitive to photochemical inactivation with amotosalen and UVA illumination. Therefore, the number of crosslinks required to "kill" the bacterium is very low (theoretically, only one crosslink is sufficient to block bacterial replication). However, bacterial genes can still be expressed, a fact that allows KBMA bacteria to retain the essential properties of live bacteria without the ability to multiply. Thus, this innovative vaccine approach, using a Listeria vectorial strain, has been demonstrated to elicit functional T-cells and long-term protective immunity that correlate with vaccine efficacy in mouse models of infectious diseases and cancer.[23]

Stable and strong heterologous protein expression. The use of bacterial systems for the production of heterologous recombinant proteins is widespread in academic and industrial sectors. Experience in the fields of molecular biology and biochemistry in codon optimization, cloning of genes, tag fusions to enable detection, secretion, co-expression of multiple proteins and genome modeling has contributed to the continuous improvement of bacterial vaccines. Plasmids are commonly used to express large quantities of recombinant proteins in bacterial hosts. However, plasmid maintenance in bacteria often requires antibiotic resistance markers, which have been discouraged in clinical applications by the Food and Drug Administration. Therefore, two strategies have been explored to produce antigen delivery systems without antibiotic resistance genes. The first approach involves plasmid stabilization using complementation systems or balanced lethal systems with the strain. The second strategy consists of inserting the heterologous gene into the bacterial chromosome either by homologous recombination[24] or by phage-specific insertion.[25]

The plasmid-based strategy has the advantage of achieving high copy numbers of heterologous genes. Mechanisms of complementation have been described previously. In *L. monocytogenes*, one mechanism is based on the complementation of the *pfrA*-deficient strain with an episomal copy of *pfrA*,[24] and the second method uses d-alanine racemase (*dal*) complementation.[26] In Salmonella, a variety of vectors have been developed based on complementation of genetic defects in the biosynthetic pathways for DNA precursors, amino acids and cell walls biosynthetic pathways (for a review see ref. 27). In plasmid-based balanced lethal systems, plasmids encode an essential protein that is required for bacterial growth and

replication, thereby forcing the bacterium to retain the plasmid.[28]

Chromosomal integration is an obvious solution to achieve the stable expression of heterologous genes, but the fact that this might entail a single copy of the transgene of interest could constitute a major drawback of this approach. The addition of multiple copies of genes of interest could potentially overcome this drawback.

Complex antigens can be delivered. We demonstrated that large proteins can be correctly secreted and translocated by the T3SS of *P. aeruginosa* when fused to the N-terminal domain of the natural exotoxin, ExoS.[29] In this system, expression was controlled by bypassing the natural regulation of T3SS expression using a strong IPTG-inducible promoter to govern the expression of the ExsA natural T3SS transcription activator protein in trans. Furthermore, using that platform, it will likely be possible to develop more sophisticated expression systems that would allow, for example, the expression and delivery of multiple antigenic proteins.[20] These properties suggest that immunization protocols with whole antigenic proteins are feasible and simultaneously provide a panel of putative mono- or multi-antigenic epitopes. This approach offers the potential for a broad spectrum of applications for vaccination, bypassing the limitations associated with the use of short peptides that are restricted to particular major histocompatibility complex (MHC) class I alleles.

Good manufacturing practices. One of the advantages of bacterial vaccine vectors is that bacteria can be easily grown and can be purified and processed inexpensively at an industrial level. However, gene deletion for attenuation often renders the bacteria more difficult to culture. Moreover, to satisfy current good manufacturing practices for drug production, bacteria need to be grown in a chemically defined medium. These two problems could be simultaneously solved if bacterial strains can be progressively adapted to grow in an optimized CD medium, as was achieved for the *P. aeruginosa* platform, CLIN-1.[20]

Stabilization/formulation. Each therapeutic agent must be stable during the period of time between its production and its administration to a patient. Moreover, it is important that reconstituting the product is easy at the time of delivery to the patient. With bacteria, it should be possible to achieve stabilization using special media or lyophilization. Here again, recent knowledge concerning the lifestyle of bacteria could aid the pharmaceutic development of live bacterial vectors. For example, in trans expression of the stress tolerance gene, *betL,* from *L. monocytogenes* increases resistance to relevant stressors, including osmo-, cryo- and baro-stress, and this gene has been shown to improve tolerance to spray- and freeze-drying in other bacterial strains.[30]

Which Companies Develop Bacteria-Based Active Vaccines?

Three companies developing live bacteria-based vehicles for in vivo antigen delivery inside APCs have been identified. Each of these companies uses engineered *L. monocytogenes* or *P. aeruginosa* strains. One project using *Salmonella typhimurium* was also started in 2008 (VION Pharmaceuticals) but appears to have been terminated.

ADVAXIS SA and ADUROBIOTECH SA have completed the most advanced trials with *L. monocytogenes.*

ADAVAXIS has 2 ongoing phase 2 trials with their ADXS-HPV product, which is a live Listeria vaccine that secretes the HPV-16 E7 antigen fused to a non-hemolytic fragment of the Lm protein listeriolysin O (LLO) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01116245?term=advaxis&rank=1 and http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01266460?term=listeria&rank=6). The results of the phase 1 trial indicate that the vaccine is safe and that an efficacy signal can be observed.[31]

ADUROBIOTECH is also conducting a phase 2 clinical trial with CRS-207, a live attenuated Listeria vaccine against mesothelin tumor-associated antigen, for use in pancreatic cancer (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01417000?term=NCT01417000&rank=1). CRS-207 was evaluated in a phase 1 trial in end-stage patients with cancers known to express mesothelin, an antigen that is overexpressed in a range of solid tumors.[32] The trial revealed a mesothelin-specific T-cell response in multiple patients, and despite an expected survival of 3–5 mo for all subjects, 6 out of 17 lived for at least 15 mo.

APCure is a new French firm that develops (preclinical stage) live *P. aeruginosa* type III-mediated vectorization of antigens from the Merkel virus, which is responsible for Merkel cell carcinoma.

Perspectives: What is More Exciting than Using Microbes for the Benefit of Mankind?

It is interesting to note that all three of these firms are closely associated with academic laboratories that have explored both the physiology of host/bacteria interactions and bacterial interactions with the immune system and have developed high-level genetic engineering tools. For the Pseudomonas-based vaccine, type III-mediated virulence has been extensively studied by many laboratories throughout the world, but the first demonstration that this bacterium could inject proteins inside immune cells (neutrophils, macrophages, DCs) and that this could help in the development of a novel antigen delivery tool was made by researchers at Grenoble University, from which the APCure firm spun off (Patent number WO2005/049644). This emphasizes the fact that only with in-depth knowledge of the ways in which bacteria interact with their natural hosts and disseminate during infection and a firm understanding of how to engineer bacteria to suit our needs can we develop an innovative therapeutic product. The future of live bacteria-based vaccines is linked to the success of the first line of developed products and to the abilities of scientists to integrate complex data into a synthetic biology approach. Neil S. Forbes have highlighted how synthetic biology techniques can be used to solve many of the key challenges that are associated with bacterial therapies, such as toxicity, stability and efficiency, and to fine-tune their beneficial features, thus enabling the development of "perfect" cancer therapies.[33]

References

1. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. Nat Rev Immunol 2010; 10:787-96; PMID:20948547; http://dx.doi.org/10.1038/nri2868.
2. AUTHOR: Please provide reference 2.
3. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol 2005; 5:296-306; PMID:15803149; http://dx.doi.org/10.1038/nri1592.
4. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. Nat Rev Immunol 2012; 12:215-25; PMID:22362354; http://dx.doi.org/10.1038/nri3167.
5. Chamekh M. Immunomodulation using genetically engineered bacteria for type III-mediated delivery of heterologous antigens and cytokines: potential application in vaccine and therapeutical developments. Immunopharmacol Immunotoxicol 2010; 32:1-4; PMID:19778176; http://dx.doi.org/10.3109/08923970902817890.
6. Epaulard O, Derouazi M, Margerit C, Marlu R, Filopon D, Polack B, et al. Optimization of a type III secretion system-based Pseudomonas aeruginosa live vector for antigen delivery. Clin Vaccine Immunol 2008; 15:308-13; PMID:18094108; http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00278-07.
7. Epaulard O, Toussaint B, Quenee L, Derouazi M, Bosco N, Villiers C, et al. Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. Mol Ther 2006; 14:656-61; PMID:17010670; http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.06.011.
8. Hegazy WA, Xu X, Metelitsa L, Hensel M. Evaluation of Salmonella enterica type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens. Infect Immun 2012; 80:1193-202; PMID:22252866; http://dx.doi.org/10.1128/IAI.06056-11.
9. Evans DT, Chen LM, Gillis J, Lin KC, Harty B, Mazzara GP, et al. Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the Salmonella type III secretion antigen delivery system. J Virol 2003; 77:2400-9; PMID:12551977; http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.4.2400-2409.2003.
10. Pan ZK, Ikonomidis G, Pardoll D, Paterson Y. Regression of established tumors in mice mediated by the oral administration of a recombinant Listeria monocytogenes vaccine. Cancer Res 1995; 55:4776-9; PMID:7585503.
11. Paterson Y, Johnson RS. Progress towards the use of Listeria monocytogenes as a live bacterial vaccine vector for the delivery of HIV antigens. Expert Rev Vaccines 2004; 3(Suppl):S119-34; PMID:15285711; http://dx.doi.org/10.1586/14760584.3.4.S119.
12. Guirnalda P, Wood L, Paterson Y. Listeria monocytogenes and its products as agents for cancer immunotherapy. Adv Immunol 2012; 113:81-118; PMID:22244580; http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00004-X.
13. Shahabi V, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. Bioeng Bugs 2010; 1:235-43; PMID:21327055; http://dx.doi.org/10.4161/bbug.1.4.11243.
14. Sleator RD, Hill C. 'Bioengineered Bugs' - a pathobiotechnology approach to probiotic research and applications. Med Hypotheses 2008; 70:167-9; PMID:17452084; http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2007.03.008.
15. Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. Methods 2006; 38:133-43; PMID:16414270; http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.09.012.
16. Stocker BA. Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine. Vaccine 1988; 6:141-5; PMID:3291451; http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(88)80017-3.
17. Brockstedt DG, Giedlin MA, Leong ML, Bahjat KS, Gao Y, Luckett W, et al. Listeria-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:13832-7; PMID:15365184; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406035101.
18. VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, et al. Regulation of host immune responses by modification of Salmonella virulence genes. Nat Med 1998; 4:1247-52; PMID:9809547; http://dx.doi.org/10.1038/3227.
19. Sauer JD, Pereyre S, Archer KA, Burke TP, Hanson B, Lauer P, et al. Listeria monocytogenes engineered to activate the Nlrc4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:12419-24; PMID:21746921; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1019041108.
20. Wang Y, Gouëllec AL, Chaker H, Asrih H, Polack B, Toussaint B. Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. J Immunother 2012; 35:223-34; PMID:22421940; http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e31824747e5.
21. Dubensky TW Jr., Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. Curr Opin Biotechnol 2012; PMID:22608846; http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.04.005.
22. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. Transfus Med Hemother 2011; 38:19-31; PMID:21779203; http://dx.doi.org/10.1159/000323937.
23. Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Luckett W, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat Med 2005; 11:853-60; PMID:16041382; http://dx.doi.org/10.1038/nm1276.
24. Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. J Immunol 2001; 167:6471-9; PMID:11714814.
25. Lauer P, Chow MY, Loessner MJ, Portnoy DA, Calendar R. Construction, characterization, and use of two Listeria monocytogenes site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002; 184:4177-86; PMID:12107135; http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.15.4177-4186.2002.
26. Verch T, Pan ZK, Paterson Y. Listeria monocytogenes-based antibiotic resistance gene-free antigen delivery system applicable to other bacterial vectors and DNA vaccines. Infect Immun 2004; 72:6418-25; PMID:15501772; http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.11.6418-6425.2004.
27. Spreng S, Viret JF. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. Vaccine 2005; 23:2060-5; PMID:15755571; http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.009.
28. Curtiss R 3rd, Galan JE, Nakayama K, Kelly SM. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. Res Microbiol 1990; 141:797-805; PMID:1966252; http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508(90)90113-5.
29. Polack B, Vergnaud S, Paclet MH, Lamotte D, Toussaint B, Morel F. Protein delivery by Pseudomonas type III secretion system: Ex vivo complementation of p67(phox)-deficient chronic granulomatous disease. Biochem Biophys Res Commun 2000; 275:854-8; PMID:10973811; http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3399.
30. Sheehan VM, Sleator RD, Fitzgerald GF, Hill C. Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of Lactobacillus salivarius UCC118. Appl Environ Microbiol 2006; 72:2170-7; PMID:16517668; http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.3.2170-2177.2006.
31. Maciag PC, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated Listeria monocytogenes vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. Vaccine 2009; 27:3975-83; PMID:19389451; http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.041.
32. Singh R, Wallecha A. Cancer immunotherapy using recombinant Listeria monocytogenes: transition from bench to clinic. Hum Vaccin 2011; 7:497-505; PMID:21422819; http://dx.doi.org/10.4161/hv.7.5.15132.
33. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. Nat Rev Cancer 2010; 10:785-94; PMID:20944664; http://dx.doi.org/10.1038/nrc2934.

Résumé

Malgré les programmes de dépistage mis en place et le vaste arsenal thérapeutique disponible, 8,2 millions de décès dans le monde ont été attribués au cancer pour l'année 2012 (données Globocan 2012, OMS). L'immunothérapie anti-tumorale est en plein essor et consiste notamment à exploiter le système immunitaire de l'hôte pour obtenir une réponse contre la tumeur. L'utilisation de vecteurs bactériens, capables de délivrer un message antigénique et de stimuler de manière concomittante l'immunité innée, fait partie des approches de vaccination anti-tumorale prometteuses. Parmi ces vecteurs, une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* mise au point par notre laboratoire présente l'intérêt de pouvoir injecter *in vivo* des antigènes de tumeur, via son système de sécrétion de type III (SST3), directement dans le compartiment intracellulaire des cellules présentatrices d'antigènes. La voie de présentation du CMH I est ainsi favorisée et permet la génération d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur exprimant l'antigène. Cependant, la poursuite des études précliniques et cliniques paraît délicate, en raison du risque infectieux lié à une bactérie pathogène, quand bien même atténuée. Lors de ce travail, nous avons donc développé une nouvelle souche de *P. aeruginosa Killed But Metabolically Active* (KBMA), incapable de se répliquer, mais toujours apte à jouer son rôle de vecteur. Une analyse de la réponse immune anti-tumorale, suite à l'immunisation par différents vecteurs, a permis de mettre en évidence une forte infiltration de la tumeur par des lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène, mais également une protection à long terme liée à la présence d'un pool majoritaire de lymphocytes T CD8+ spécifiques effecteurs mémoires. Enfin nous avons cherché à appliquer cette technologie à l'antigène de tumeur anhydrase carbonique 9 (AC9), exprimé par de nombreuses tumeurs solides chez l'homme.

Abstract

Despite cancer screening programs and the available therapeutic armamentarium, 8.2 million deaths worldwide were due to cancer in 2012 (data Globocan 2012, WHO). The antitumor immunotherapy is booming and aims at using the immune system of the host as a response against the tumor. The use of bacterial vectors, able to deliver an antigenic message and concomitantly stimulate innate immunity, is one of the most promising approaches to antitumor vaccination. Among these vectors, the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* developed by our laboratory has the advantage of being able to inject *in vivo* tumor antigens via its type III secretion system (T3SS) directly in the intracellular compartment of antigen-presenting cells. The MHC I presentation pathway is thus favored and allows the generation of a cytotoxic T lymphocytes response against antigen-expressing tumors. However, further preclinical and clinical studies remain difficult, because of the risk of infection related to a bacterial pathogen, even if attenuated. In this work, we have developed a new strain of *P. aeruginosa* Killed But Metabolically Active (KBMA) unable to replicate, but still able to play its role as a vector. An analysis of the antitumor immune response following immunization with different vectors, allowed to demonstrate a strong tumor infiltration by antigen-specific CD8+ T lymphocytes, but also a long-term protection related to the presence of a major pool of antigen-specific effector memory CD8+ T cells. Finally we are seeking to apply this technology to the tumor antigen carbonic anhydrase 9 (CA9), expressed by many solid tumors in humans.