



HAL
open science

Développement de constructions liposomiques personnalisables pour une thérapie ciblée du cancer : la vaccination antitumorale

Célia Jacobberger-Foissac

► **To cite this version:**

Célia Jacobberger-Foissac. Développement de constructions liposomiques personnalisables pour une thérapie ciblée du cancer : la vaccination antitumorale. Cancer. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ065 . tel-03270822

HAL Id: tel-03270822

<https://theses.hal.science/tel-03270822>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire CAMB - UMR 7199 CNRS / Unistra

THÈSE présentée par :

Célia JACOBBERGER--FOISSAC

soutenue le : **21 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du vivant - Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Immunologie

**Développement de constructions
liposomiques personnalisables pour une
thérapie ciblée du cancer : la vaccination
antitumorale**

THÈSE dirigée par :

Mme FOURNEL Sylvie

Mme HEURTAULT Béatrice

Professeur, Université de Strasbourg

Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. TROTTEIN François

Mme PREAT Véronique

Directeur de recherches, Institut Pasteur de Lille

Professeur, Université Catholique de Louvain (Belgique)

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. LEHMANN Maxime

Mme PIAGGIO Eliane

Professeur, Université de Strasbourg

Directeur de recherches, Institut Curie de Paris

Remerciements

Voici déjà l'aube du rendu de mon manuscrit de thèse et les mots me manquent pour trouver les remerciements justes et honnêtes pour chaque personne qui m'a encouragée, accompagnée et soutenue au cours de ces quatre années de doctorat...

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de soutenance, Pr. Véronique Préat, Dr. François Trottein, Dr. Eliane Piaggio et Pr. Maxime Lehmann pour avoir accepté de juger ces travaux.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR7199), à la faculté de pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden, sous la co-direction du Pr. Sylvie Fournel et du Dr. Béatrice Heurtault. J'aimerais exprimer ma gratitude à mes deux directrices de thèse, pour tout le temps qu'elles m'ont accordé, pour leurs conseils et leur soutien tout au long de ces cinq années. Merci à Béatrice de m'avoir permis d'apprendre la formulation des liposomes et de m'avoir inculqué la rigueur et la méthodologie des galénistes. Merci à Sylvie de m'avoir offert l'opportunité d'enseigner lors des TP et TD d'Immunologie pendant deux ans. C'est avec regret que j'ai dû arrêter l'enseignement, mais je garderai toujours cette fibre enseignante que tu m'as transmise. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, et merci pour votre aide précieuse dans l'écriture et la relecture de ce manuscrit. Finalement, je ne pourrais jamais vous remercier assez pour avoir soutenu ma candidature pour le post-doc en Australie, vos lettres de références ont grandement contribué à mon acceptation.

J'ai été accueillie au sein de l'équipe anciennement BIOVEC désormais 3BIO, sous la direction du Dr. Benoît Frisch, puis codirection avec le Dr. Antoine Kichler. J'aimerais exprimer ma reconnaissance à Benoît pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir répondu à toutes mes questions naïves de biologiste sur la Chimie. Merci à Antoine et à Benoît pour votre présence et vos conseils lors de nombreuses préparations aux congrès.

Merci également au Dr. Jean-Serge Rémy, directeur de l'UMR 7199, pour son accueil au sein de l'UMR mais également dans le conseil du laboratoire, en tant que représentante des doctorants et post-doctorants.

Les collègues

Je remercie chaleureusement les anciens, actuels et nouveaux membres de l'équipe BIOVEC / 3BIO, pour leurs conseils et leurs aides précieuses. Merci aux anciennes du bureau qui m'ont permis de gagner en autonomie et m'ont appris à être indépendante. Merci à toutes mes collègues de bureau et de paillasse pour leur joie de vivre, nos coups de gueule autour d'un café et d'un morceau de gâteau, vos conseils et votre soutien. Je suis également reconnaissante envers Alex, pour avoir contribué à l'amélioration de mon orthographe et m'avoir appris à parler correctement français (si, si, reconnais-le je me suis améliorée !). Merci les filles (et Alexandre 😊) !

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes qui m'ont aidée lors des « jours de sacrifice » et qui m'ont permis de pouvoir partir à des heures décentes lors de ces journées marathons. Merci Anaïs, déesse de la chirurgie et de la manipulation *in vivo*, qui m'a beaucoup aidée pendant un an. Merci à May, jeune padawan, j'espère n'avoir pas été trop dure avec toi et je suis convaincue que tout se passera bien pour toi quand je serai partie, aie plus confiance en toi ! Merci également à Cendrine, pour ton aide précieuse lors des expériences *in vivo*, pour m'avoir appris la rigueur, l'organisation, les « bonnes pratiques de salle de culture ». J'ai beaucoup grandi humainement grâce (à cause ? 😊) de toi.

Bien évidemment, je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire pour m'avoir intégrée dans l'équipe et pour avoir été disponibles pour répondre à mes innombrables questions (Maria, Marcella, Patrick, Line). Petite pensée pour mes deux stagiaires officielles, qui m'ont aidée pour une période de 2 à 3 mois (Aline et Lucie). Je suis heureuse de vous avoir encadrées et conseillées pour votre orientation professionnelle, je vous souhaite d'être aussi épanouie professionnellement que je le suis aujourd'hui !

Merci à toutes ces collègues qui sont devenues des amies...

Hanadi *habibi*, ma « sœur » de thèse, merci pour ton soutien et ton sourire. Toi qui travaillais toujours plus longtemps que tous les autres ; ta bonne humeur et ton inépuisable motivation m'ont permis de tenir le coup. Je regrette que tu ne sois pas restée plus longtemps en France, j'ai adoré passer mes week-ends en tête-à-tête avec toi au laboratoire, te faire découvrir la gastronomie française et alsacienne et visiter ensemble l'Alsace. Merci de m'avoir accueillie au Liban pour ce qui a été les plus belles vacances de ma vie jusqu'à présent. Nos discussions et débats passionnés sur la religion, les relations humaines, l'amour, la vie.... m'ont vraiment ouvert l'esprit. Je suis une personne différente aujourd'hui grâce à toi.

Merci à Manon, qui est arrivée au labo en même temps que moi et est devenue un exemple d'une vraie réussite de thèse pour moi. Il m'en aura fallu du temps mais je crois que je ne te jalouse plus désormais. Merci pour toutes les pauses café que nous avons passées ensemble. Ces moments de détente, de coup de gueule et de commérages vont me manquer. Au final, on ne se sera pas tellement que ça motivées à aller au sport mais ce n'était pas l'envie qui nous manquait (ou pas ^^) !

Florence, tu as également été une très belle rencontre, notre amitié s'est imposée d'elle-même lors de ta première année de thèse et n'a cessé de se renforcer depuis. Je mentirais en disant que tu n'as pas été une source de distraction, mais tu as surtout été une importante source de réconfort lors de cette dernière année de thèse. Merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir encouragée et comprise. Nos séances de psychanalyse, de philosophie de comptoir et nos longues discussions dans ta voiture devant chez moi vont me manquer. Je continuerais de penser à toi chaque « snaccident » 😊.

Je remercie ensuite la team « Wagner » pour tous ces moments partagés, les repas le midi (pardon à 11h45 !), les camarades de « ping-pong », puis les adversaires du « tarot ». Merci pour votre bonne humeur, je n'oublierai pas la virée à Amsterdam avec les ukrainiens (Sacha, Sergii et Igor), les câlins et la bonne humeur d'Igor, les conseils de Sylvain le grand frère scientifique, les soirées jeux de sociétés avec Seb et Fabien, la fausse timidité de Charlotte (😊) et nos séances de potins amoureux...

Les amis et la famille

Parce que oui, il est possible d'avoir une vie sociale, même en thèse, je souhaite également remercier mes amis.

Merci à Clémence qui m'a soutenue depuis le Master et a toujours été là pour m'aider, me consoler, et me soutenir grâce à la nourriture. Nos soirées « grosses » me manquent, c'est quand même la base de faire un repas uniquement composé de churros quand on déprime. Tu étais déjà partie loin au pays de la frite et maintenant je m'en vais encore plus loin au pays des Kangourous 😞. Mais je sais qu'on se reverra très vite et on n'est jamais qu'à un clavier de téléphone l'une de l'autre. Tu resteras à jamais « ma coloc » de choc. Je voulais aussi te dire « Bon anniversaire !!!! ». Merci d'être là aujourd'hui le jour de tes 25 ans !

Merci aux amis de la danse, nous étions au début un petit groupe de passionnés, assez fous pour aller une semaine dans un festival de danse de couple à Avoriaz avec Caroline, Célia, Marion et le pauvre Sébastien, seul homme de la troupe. La troupe s'est maintenant beaucoup agrandie. Même si je n'ai pas toujours pu m'investir et participer autant que vous aux soirées et festivals, je garde un très bon souvenir de ces nuits sur les pistes de danse, après-midi sur les quais et les nombreuses soirées jeux dans les bars ou dans vos salons. C'est aussi grâce à ces petites distractions que j'ai pu trouver mon équilibre ! Un merci tout particulier à Nathalie, pour ton soutien dans ces derniers mois de rédaction, pour m'avoir écoutée me plaindre lors de nos déjeuners (ir)réguliers et pour ton incroyable gentillesse. Chers amis danseurs, je pars en éclaireuse pour évaluer la qualité des stages de West Coast Swing en Australie et je vous y attendrai 😊.

Un grand merci aux « copains de Pharma ». Merci pour toutes les soirées que nous avons passées ensemble mais également pour les « vacances des copains », « le ski des copains », le « Noël des copains » et toutes les autres excuses pour se réunir. Ma rédaction n'aurait pas été la même sans les dizaines de blagues et *memes* que vous partagiez tous les jours sur le groupe Whatsapp de « La communauté ». J'espère vous revoir tous très bientôt pour l'édition des « Copains en Australie » ... Que ce soit dit « Preums » pour le premier verre de chaque bouteille ouverte le jour de ma soutenance !

Merci à ma grande et nombreuse famille : mes parents, mes deux frères, mes trois sœurs, les pièces rapportées et mon neveu adoré (le plus mignon bébé du monde). Merci d'avoir été là pour moi depuis toujours et de m'avoir poussée à sortir de ma bulle de temps à autre.

Pour finir, le plus important... Eric. Tu as été la plus belle rencontre que j'ai faite au laboratoire. Merci à toi de m'avoir supportée pendant ces quatre années de thèse, d'avoir été mon confident et de m'avoir écouté me plaindre beaucoup (trop ?) parfois. Je ne sais pas si je serais parvenue au bout de cette aventure sans ton soutien et ta confiance. J'espère t'avoir rendu fier de moi et je suis heureuse de savoir que tu continueras à me suivre dans une plus grande aventure et pour pouvoir (enfin !) partager à nouveau notre quotidien.

Pour tous ceux que j'ai oublié ou que je n'ai pas cité personnellement lors de ces quelques lignes, vous qui avez participé à ma réussite actuelle et m'avez soutenue, merci infiniment. C'est un peu grâce à vous tous que je me suis épanouie professionnellement et personnellement. Je vais bientôt partir pour de nouvelles aventures au pays des Kangourous, mais je ne vous oublierai pas...

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Abréviations	4
INTRODUCTION	9
A. LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTITUMORALE	11
1. Historique : la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs	11
2. Le cycle de l'immunité du cancer.....	12
2.1. Antigénicité des tumeurs	13
2.1.1. <i>Oncogenèse</i>	13
2.1.2. <i>Les antigènes associés à la tumeur</i>	13
2.2. Maturation et présentation des antigènes par la cellule dendritique	15
2.2.1. <i>Les sous-populations de cellules dendritiques</i>	15
2.2.2. <i>Maturation des cellules dendritiques</i>	17
2.2.3. <i>Apprêtement de l'antigène</i>	18
2.3. Reconnaissance antigénique et différenciation des lymphocytes T.....	20
2.3.1. <i>Activation des lymphocytes T helper</i>	20
2.3.2. <i>Différenciation des lymphocytes T cytotoxiques</i>	20
2.4. Destruction des cellules tumorales.....	21
3. Autres cellules immunitaires impliquées dans la lutte antitumorale	22
3.1. Les cellules NK	22
3.2. Les cellules NKT	24
3.3. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	25
4. De l'élimination à l'échappement tumoral	26
4.1. Les trois phases de la progression tumorale	26
4.1.1. <i>Elimination</i>	26
4.1.2. <i>Equilibre</i>	27
4.1.3. <i>Echappement</i>	28
4.2. Mécanismes d'échappement tumoral.....	28
4.2.1. <i>Réduction de la reconnaissance des tumeurs</i>	28
4.2.1.1. <i>Mécanismes inhérents aux cellules tumorales</i>	28
4.2.1.2. <i>Matrice extracellulaire</i>	30

4.2.2.	<i>Résistance directe aux mécanismes effecteurs cytotoxiques</i>	30
4.2.3.	<i>Micro-environnement tumoral supprimeur</i>	30
4.2.3.1.	<i>Production de cytokines immunosuppressives</i>	30
4.2.3.2.	<i>Recrutement des cellules immunosuppressives</i>	31
4.2.3.3.	<i>Récepteurs inhibiteurs « checkpoint »</i>	31
B.	L'IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS	33
1.	Différentes classes d'immunothérapie	33
1.1.	Objectifs et actualités thérapeutiques	33
1.2.	Classification des immunothérapies	34
1.2.1.	<i>Immunothérapie non spécifique</i>	35
1.2.2.	<i>Immunothérapie passive spécifique</i>	35
1.2.3.	<i>Immunothérapie active spécifique</i>	37
1.3.	Combiner l'immunothérapie avec d'autres traitements	38
1.4.	Avantages et inconvénients de l'immunothérapie	41
2.	La vaccination thérapeutique	42
2.1.	Différentes classes de vaccins thérapeutiques	42
2.1.1.	<i>Les vaccins à base de cellules tumorales entières ou de lysat</i>	43
2.1.2.	<i>Les vaccins à base d'acides nucléiques</i>	44
2.1.3.	<i>Les vaccins à base de peptides tumoraux</i>	45
2.1.3.1.	<i>Développement et évaluation clinique</i>	45
2.1.3.2.	<i>Avantages des vaccins peptidiques</i>	46
2.1.3.3.	<i>Limites des vaccins peptidiques</i>	48
3.	Les trois éléments vaccinaux essentiels	49
3.1.	Le peptide CD8	49
3.2.	Le peptide CD4	51
3.3.	Adjuvants	53
3.3.1.	<i>Systèmes de délivrance</i>	54
3.3.1.1.	<i>Effet dépôt et émulsion</i>	54
3.3.1.2.	<i>Vecteurs</i>	54
3.3.2.	<i>Immunostimulants (agonistes des PRR)</i>	55
3.3.2.1.	<i>Les récepteurs PRR des cellules dendritiques</i>	56
3.3.2.2.	<i>Autres immunostimulants</i>	58
3.3.2.3.	<i>Les agonistes des TLR et NLR en vaccination</i>	59
3.3.3.	<i>Importance du choix de l'adjuvant</i>	60

C. LIPOSOMES ET VACCINATION	63
1. Vaccins nanoparticulaires	63
1.1. Définitions	63
1.2. Les nanoparticules à base de polymères	64
1.3. Les nanoparticules inorganiques	65
1.4. Les nanoparticules lipidiques	65
2. Les liposomes	66
2.1. Propriétés physicochimiques des liposomes	66
2.1.1. Généralités	66
2.1.2. Taille et lamellarité	67
2.1.3. Potentiel zêta	68
2.1.4. Association des antigènes et des adjuvants	69
2.2. Intérêts des liposomes en vaccination	72
2.2.1. Biocompatibilité	72
2.2.2. Vectorisation	72
2.2.3. Versatilité	73
2.2.4. Capture, internalisation et cross-présentation par les DC	73
2.2.5. Fonctionnalisation	75
2.3. Inconvénients des liposomes	76
2.4. Les vaccins liposomiques sur le marché ou en essais cliniques	77
D. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	79
1. Résultats préliminaires	79
2. Objectifs de la thèse	81
3. Publications et communications	83
CHAPITRE 1	87
A. RESUME DE L'ETUDE	89
1. Objectifs	89
2. Résultats	90
3. Conclusions	90
B. ARTICLE #1	91

CHAPITRE 2.....	121
A. RESUME DE L'ETUDE	123
1. Objectifs.....	123
2. Résultats.....	123
3. Conclusions	125
B. ARTICLE #2.....	125
CHAPITRE 3.....	165
A. INTRODUCTION	167
1. Agonistes des PRR et nanoparticules.....	167
2. Association d'agonistes des TLR.....	167
2.1. Administration conjointe	168
2.2. Association à une même nanoparticule.....	168
2.3. Voies de signalisation des TLR	168
3. Association d'agonistes des TLR-NLR.....	170
4. Objectifs du chapitre	172
B. MATERIELS ET METHODES	173
1. Formulation et caractérisation des formulations liposomiques.....	173
1.1. Lipides, adjuvants et peptides	173
174	
1.2. Formulation des SUV	174
1.3. Conjugaison des peptides à la surface des liposomes	176
1.4. Caractérisation des formulations liposomiques	176
1.4.1. <i>Diamètre</i>	176
1.4.2. <i>Potentiel zêta</i>	176
1.5. Dosage de la phosphatidylcholine.....	177
1.6. Dosage des peptides.....	177
2. Evaluation <i>in vivo</i> des constructions liposomiques	177
2.1. Souris.....	177
2.2. Lignée cellulaire tumorale	178
2.3. Calendrier d'injection.....	178
2.4. Analyse de la réponse immunitaire	179
2.4.1. <i>ELISpot (IFN-γ)</i>	179

2.4.2. <i>ELISA (IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-13, IL-6, IL-17)</i>	179
3. Analyses statistiques	180
C. RESULTATS.....	181
1. Formulation et caractérisation des vaccins liposomiques	181
2. Evaluation de l'association des agonistes TLR2/6 - NOD1 au sein des liposomes	182
3. Evaluation de l'association des agonistes de TLR4 - NOD1 au sein des liposomes	186
D. DISCUSSION.....	190
DISCUSSION ET PERPECTIVES	193
A. PLATEFORME ET STRATEGIE DE CONCEPTION VACCINALE	195
1. Propriétés physicochimiques et production des vaccins	195
2. Stratégie de conception vaccinale	197
3. Importance de la sélection des peptides.....	198
B. CALENDRIER DE VACCINATION ET STADE DE PROGRESSION TUMORALE.....	200
1. Stade avancé de progression tumorale	200
2. Calendrier vaccinal	201
C. SUIVI DE LA REPONSE IMMUNITAIRE.....	202
D. OPTIMISATION DES FORMULATIONS VACCINALES	205
1. Synergie des agonistes des TLR ou NLR.....	205
2. Ciblage des cellules dendritiques	205
E. LES ENJEUX DE LA VACCINATION THERAPEUTIQUE	206
1. Quels sont les freins à la vaccination contre le cancer ?	206
2. L'intérêt de combiner la vaccination avec d'autres immunothérapies	207
3. Vaccins personnalisés et médecine adaptée.....	209
4. Le vaccin idéal	211
BIBLIOGRAPHIE.....	212

Liste des figures

Figure 1. Le cycle immunitaire du cancer.	12
Figure 2. Les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines.	16
Figure 3. Cross-présentation des antigènes tumoraux par une cellule dendritique.	19
Figure 4. Réponse immunitaire cytotoxique.	21
Figure 5. Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules « natural killer ».	23
Figure 6. Les trois E de la progression tumorale.	27
Figure 7. Mécanismes principaux d'échappement tumoral.....	29
Figure 8. Structure d'un CAR, chimeric antigen receptor.	37
Figure 9. Autres traitements impactant positivement la réponse immunitaire antitumorale.	39
Figure 10. Stratégies vaccinales contre le cancer.	43
Figure 11. Développement d'un vaccin peptidique personnalisé.....	51
Figure 12. Les PRR membranaires.	57
Figure 13. Les PRR cytosoliques.	58
Figure 14. Principaux vecteurs nanoparticulaires à visée vaccinale.	64
Figure 15. Représentation schématique de la structure des liposomes.....	66
Figure 16. Structure de différentes formes de liposomes, associée à leurs propriétés de ciblage	67
Figure 17. Méthodes d'association de composants vaccinaux aux liposomes.	71
Figure 18. Interaction avec les liposomes et la cellule présentatrice de l'antigène.	74
Figure 19. Représentation schématique des constructions liposomiques développées dans l'équipe et des acteurs immunitaires ciblés.	79
Figure 20. Résumé schématique des différentes voies de vaccination évaluées dans l'équipe.	80
Figure 21. Résumé des voies de signalisation synergiques des TLR dans la cellule dendritique.....	169
Figure 22. Résumé des voies de signalisation synergiques des TLR et NLR dans la cellule dendritique.....	171
Figure 23. Formulations liposomiques développées dans le projet.	172
Figure 24. Adjuvants et ancre incorporés dans la membrane des SUV.....	174
Figure 25. Méthode de formulation des liposomes SUV.....	175

Figure 26. Efficacité antitumorale de l'association d'agonistes du TLR2/6 et/ou de NOD1.	183
Figure 27. Réponse immunitaire induite par l'association d'agonistes du TLR2/6 et/ou de NOD1.	184
Figure 28. Production de cytokines par les splénocytes de souris vaccinées avec des liposomes contenant un agoniste du TLR2/6 et/ou NOD1.	185
Figure 29. Efficacité thérapeutique de l'association d'agonistes du TLR4 et/ou de NOD1.	187
Figure 30. Production de cytokines par les splénocytes de souris vaccinées par des liposomes contenant un agoniste du TLR4 et /ou de NOD1.	188
Figure 31. Résumé des différentes formulations développées lors du Chapitre 1.	198
Figure 32. Mécanismes hypothétiques d'action des liposomes TLR4.	203

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des antigènes tumoraux.....	14
Tableau 2. Liste des immunothérapies déjà sur le marché.....	34
Tableau 3. Stratégies d'immunothérapie non spécifique.	35
Tableau 4. Stratégies d'immunothérapie passive.	36
Tableau 5. Stratégies d'immunothérapie active.	38
Tableau 6. Les essais cliniques de vaccins peptidiques phase III.	47
Tableau 7. Vaccins liposomiques et peptidiques contre le cancer en essais cliniques. ...	77
Tableau 8. Cahier des charges.....	82
Tableau 9. Constituants des formulations liposomiques.....	173
Tableau 10. Composition molaire des SUV.	175
Tableau 11. Références des anticorps utilisés lors de l'ELISpot et de l'ELISA.....	180
Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques des vaccins liposomiques.	182

Abréviations

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium lysing buffer</i>
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
APC	<i>AlloPhycoCyanin</i>
C12iEDAP	<i>Lauroyl-γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
Chol	Cholestérol
CLR	<i>C-type Lectin Receptor</i>
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CPNPC	Cancer du Poumon « Non à Petites Cellules »
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DLN	<i>Draining Lymph Node</i>
Man₂DOG	Dioléylglycérol-dimannose
DPGmal	19-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecane-1,2-diyl dipalmitate
cDC	Cellule Dendritique conventionnelle
pDC	Cellule Dendritique plasmacytoïde
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration (US)</i>
FITC	Fluorescein IsotTioCyanate
Fluorescamine	4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dione
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
HBV	Virus de l'Hépatite B
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
HA	Hémagglutinine A
HPV	<i>Human PapillomaVirus</i>
HTLV	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
IFA	<i>Incomplet Freund Adjuvant</i>
ISCOM	<i>ImmunoStimulating COMplex</i>

i.v.	(par voie) IntraVeineuse
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
LLC :	Leucémie Lymphoïde Chronique
LIT	Lymphocyte Infiltrant les Tumeurs
LNH	Lymphome Non Hodgkinien
Lp.	Liposome
MAMP	<i>Microbe-Associated Molecular Pattern</i>
MLV	<i>MultiLamellar Vesicle</i>
MDP	Muramyl DiPeptide
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i>
MPLA	Monophosphoryl Lipid A
MR	Récepteur au Mannose
MVA	<i>Modified Vaccinia virus Ankara</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NLR	<i>Nod-Like Récepteur</i>
NLS	Nanoparticule Lipidique Solide
NK	<i>Natural Killer</i>
NSCLC	<i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i> (CPNPC en français)
Pam₂CAG	S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-alanyl-glycine
PADRE	<i>PAn-DR binding synthetic helper</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PC	L- α -PhosphatidylCholine
PDI	<i>PolyDispersity Index</i>
PEG	Poly (Ethylène Glycol)
PEI	Poly(Ethylène Immine)
PG	L- α -Phosphatidyl-DL-Glycerol
PL	PhosphoLipides
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RenCa	<i>Renal Carcinoma</i>
RES	Système Réticulo-Endothélial
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RLR	<i>Rig-Like Receptor</i>
RT	<i>Room Temperature</i>

s.c.	(par voie) Sous-Cutanée
SNS	Sérum Normal de Souris
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>
TA	Température Ambiante
TAA	<i>Tumor Associated Antigen</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
Th	Lymphocytes T helper
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TT	Toxine Tétanique
VLP	<i>Virus-Like particule</i>

Préambule

Le cancer est une maladie connue depuis l'Antiquité et l'une des principales causes de mortalité dans le monde. L'origine du mot « cancer » provient du grec « karkinos », appellation donnée par le médecin Hippocrate qui a comparé l'apparence des tumeurs à celle d'un crabe. En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde a été estimé à 14,2 millions et 8,2 millions de personnes atteintes de cancer sont décédées cette même année (Source : Cancer Research UK). Le nombre de personnes touchées par cette maladie est en constante augmentation depuis 10 ans et atteindra 13,1 millions en 2030, d'après les estimations.

La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont actuellement les trois principales stratégies de lutte contre le cancer. En dépit d'approches de plus en plus performantes et optimisées, ces traitements dits « classiques » gardent comme inconvénient majeur de ne pas être spécifiques des cellules tumorales et sont responsables de dégâts infligés aux tissus sains qui engendrent de lourds effets secondaires. Pour pallier à cela, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies plus ciblées, qui pourraient être utilisées seules ou en complément des traitements existants.

L'immunothérapie antitumorale qui exploite la capacité intrinsèque du système immunitaire à détruire les tumeurs représenterait une alternative intéressante, plus spécifique et moins délétère pour l'organisme. Cette stratégie a été élue « avancée majeure de l'année 2013 » par le magazine Science, suivi par l'association des oncologues américains (ASCO) en 2016, qui a confirmé l'importance croissante des traitements faisant appel au système immunitaire des malades. Sean Parker, co-fondateur de Napster et ancien président de Facebook, a également investi \$250 millions en 2016 pour la construction du « Parker Institute for Cancer Immunotherapy », réunissant plus de 300 immunologistes dans un effort commun pour combattre le cancer.

Afin de rétablir une réponse immunitaire adaptée, plusieurs stratégies ont été envisagées dont la vaccination thérapeutique qui consiste à injecter des éléments immunogènes, spécifiques des cellules tumorales, chez un patient atteint de cancer. Cette méthode ne vise pas à prévenir l'apparition d'un cancer, mais bien à soigner le patient en éduquant ou stimulant son propre système immunitaire à reconnaître et détruire

spécifiquement les cellules tumorales. Les vaccins thérapeutiques peuvent être composés de cellules cancéreuses, fragments cellulaires, protéines ou peptides tumoraux.

De nombreux vaccins antitumoraux sont actuellement en cours d'évaluation préclinique et clinique, mais à ce jour un seul vaccin thérapeutique a montré une efficacité suffisamment importante pour permettre sa commercialisation (sipuleucel-T, Provenge®, Dendreon Corporation). En effet, une tumeur peut comporter plusieurs centaines de mutations génétiques dont une fraction seulement est partagée par plusieurs patients, rendant difficile l'utilisation d'un vaccin unique destiné à un type de cancer. L'existence d'une très forte hétérogénéité intratumorale et l'influence du micro-environnement de la tumeur sont également des facteurs à prendre en compte, qui peuvent être responsables de l'échec actuel de la vaccination antitumorale humaine.

Les récents progrès en génomique et cartographie génétique rendent dorénavant possible l'identification rapide de mutations tumorales à partir de biopsies humaines directement au chevet du patient. Ces avancées technologiques ont permis l'émergence d'une importante innovation thérapeutique : la vaccination antitumorale personnalisée, permettant de cibler une ou plusieurs protéines anormales identifiées au sein d'une tumeur et d'être adaptée à chaque patient.

Les premiers essais cliniques de vaccination personnalisée ont déjà été entrepris chez des patients atteints de mélanome, et ont apporté la preuve de leur faisabilité, leur biocompatibilité et leur efficacité thérapeutique. La médecine personnalisée n'est désormais plus une fiction ; un effort commun est en cours pour améliorer la rapidité des méthodes d'identification d'antigènes, l'utilisation de meilleurs systèmes de délivrance vaccinale et l'identification de facteurs immunitaires et environnementaux permettant de prévoir l'échec ou la réussite d'une formulation vaccinale. La thérapie vaccinale personnalisée représente un nouvel espoir pour le traitement du cancer et pourrait bien paver la voie vers une médecine plus humaine !

Mon projet de thèse fait partie intégrante de cette problématique d'amélioration des vaccins contre le cancer et de personnalisation des traitements. J'ai souhaité participer à cette thématique innovante en développant et évaluant une plateforme vaccinale personnalisable qui sera présentée dans ce manuscrit.

INTRODUCTION

Tout grand **progrès** scientifique est né d'une nouvelle audace de l'**imagination**.

John Dewey

A. LA REPOSE IMMUNITAIRE ANTITUMORALE

La capacité innée que possède notre corps de se défendre contre des organismes pathogènes grâce à ses propres défenses immunitaires est une notion bien ancrée dans les esprits. Pourtant, certaines personnes ignorent encore que le système immunitaire est également capable d'identifier et d'empêcher le développement de cellules tumorales lors d'un processus appelé immunosurveillance.

1. Historique : la théorie de l'immunosurveillance des tumeurs

La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs a été énoncée pour la première fois par Paul Ehrlich en 1909, qui écrivit « ...au cours du très complexe processus de développement fœtal et post-fœtal, les cellules aberrantes deviennent inhabituellement répandues. Heureusement, chez la majorité des individus, ces cellules restent entièrement latentes grâce à des mécanismes positifs de l'organisme » (transcrit à partir de Ribatti 2016). Néanmoins, les connaissances en immunologie et la faiblesse technologique de l'époque ne permirent pas de prouver expérimentalement cette hypothèse.

Il fallut attendre près de 50 ans pour que les deux biologistes Thomas et Sir Macfarlane Burnet évoquent successivement la théorie de l'immunosurveillance. Leur postulat était que le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules tumorales grâce à l'expression d'antigènes spécifiques des tumeurs puis de les éliminer pour maintenir l'homéostasie de l'organisme. La première démonstration de cette capacité fût réalisée en 1953 par Gross qui échoua à faire une greffe hétérologue d'un sarcome murin, suivi par Foley, qui démontra l'immunogénicité de tumeurs induites chimiquement (Ribatti 2016).

Le concept d'immunosurveillance permis d'expliquer de nombreux phénomènes médicaux encore incompris tels que la rémission spontanée de tumeur (Jessy 2011), le rejet de greffe syngénique de tissus cancéreux (Burnet 1954), la présence d'infiltrats immunitaires observés dans différents tissus tumoraux (Epstein & Fatti 1976; Jass 1986; Lipponen et al. 1992) et l'incidence accrue de certains cancers chez les individus immunodéprimés (Penn 1981). Plusieurs années se sont écoulées depuis cette découverte, permettant l'élucidation des mécanismes biologiques impliqués dans la réponse immunitaire contre le cancer.

2. Le cycle de l'immunité du cancer

Le mécanisme immunitaire le plus étudié à l'origine de la destruction des cellules cancéreuses est la réponse immunitaire adaptative de type cellulaire, médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. Les différentes étapes nécessaires à l'élimination des tumeurs ont été décrites par Chen et Mellman qui les ont représentées sous la forme d'un cycle, nommé le cycle de l'immunité du cancer (Chen & Mellman 2013) (**Figure 1**).

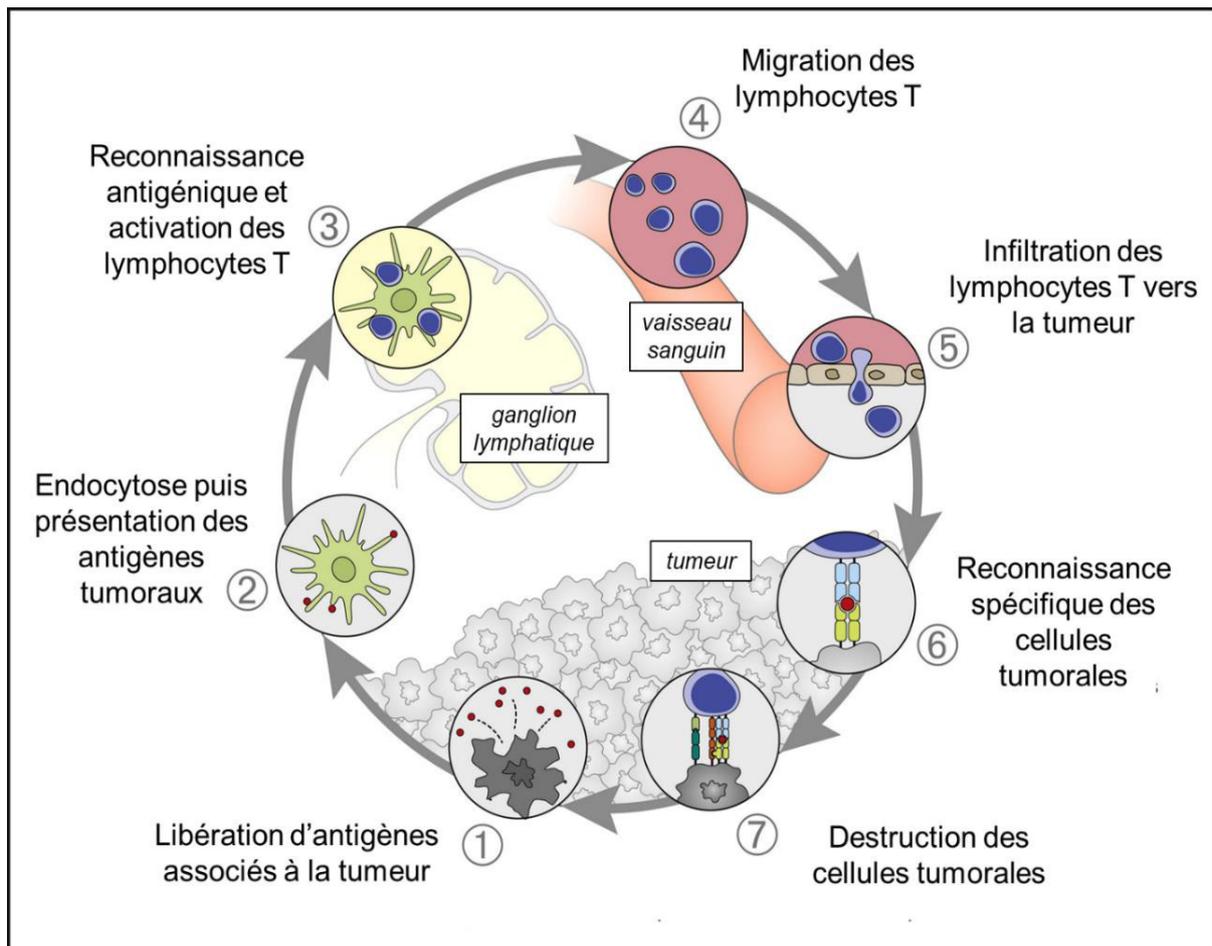


Figure 1. Le cycle immunitaire du cancer.

La réponse immunitaire antitumorale est un processus cyclique qui s'auto-entretient, l'accumulation d'éléments immunogènes suite à la destruction tumorale permettant d'amplifier la réponse des lymphocytes T. Ce cycle est divisé en 7 étapes. La destruction des cellules cancéreuses entraîne la libération d'antigènes tumoraux (1) qui sont captés par les cellules dendritiques (2) puis présentés à leur surface aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques (3). La reconnaissance antigénique va induire la différenciation des lymphocytes T qui vont alors migrer (4) et infiltrer la tumeur (5) dans le but de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales (6) et de les détruire (7). D'après (Chen et Mellman 2013).

2.1. Antigénicité des tumeurs

2.1.1. *Oncogenèse*

Plusieurs causes peuvent être à l'origine de l'apparition des tumeurs (génétiques, hormonales ou environnementales) et ont été largement documentées dans de nombreuses revues (Le Marchand 2005; Colditz et al. 2006; Colditz & Wei 2012). Ces différents facteurs aggravants ont pour point commun d'induire des modifications métaboliques, génétiques et épigénétiques chez les cellules saines, entraînant leur progressive transformation en cellules tumorales (Hanahan & Weinberg 2011).

Le développement d'un cancer est un mécanisme complexe le plus souvent attribué à l'apparition et la sélection de cellules mutées ayant une meilleure capacité à proliférer, survivre, et induire une angiogenèse (Cooper 2000). Ce sont le plus souvent des modifications apportées au niveau des gènes contrôlant le cycle cellulaire qui sont à l'origine de ce processus d'oncogenèse. La prolifération anarchique des cellules mutées va entraîner une instabilité génique responsable de l'addition de nouvelles mutations et/ou de réarrangements chromosomiques (Janssen & Medema 2013). Cette divergence génique peut conduire à i) la production de protéines modifiées, ii) la surexpression de molécules habituellement présentes sur les cellules non transformées ou iii) la (ré)-expression de molécules normalement produites à d'autres moments du développement et par d'autres types cellulaires. Ces molécules anormales, présentes dans les cellules cancéreuses, sont appelées antigènes tumoraux. Elles sont reconnues comme un motif « dangereux » par le système immunitaire.

2.1.2. *Les antigènes associés à la tumeur*

Le premier antigène associé à la tumeur (*tumor-associated antigen*, TAA) humain a été mis en évidence en 1989 suite à l'établissement d'une lignée cellulaire de lymphocytes T capables de reconnaître des cellules tumorales pancréatiques, prélevées dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (Barnd et al. 1989). Cet antigène protéique, qu'on nomma MUC1, est une glycoprotéine membranaire que l'on retrouve principalement dans les épithéliums sains et qui est exprimé dans de nombreux adénocarcinomes, plusieurs myélomes et quelques lymphomes B. Dans les tissus sains, cette protéine est peu exprimée et O-glycosylée alors qu'elle est surexprimée et peu glycosylée dans les cellules tumorales.

Suite à cette découverte, de nombreux autres antigènes humains et murins furent découverts successivement (van der Bruggen et al. 1991; Brichard et al. 1993; Fisk et al. 1995; Chen et al. 1997; Lim et al. 2001). Ces antigènes, principalement de type protéique, proviennent de différents compartiments cellulaires (cytoplasme, membrane plasmique, noyau) ou peuvent être sécrétés. Aujourd'hui, plusieurs centaines de TAA ont été identifiés et ont été classés dans différentes catégories selon leur profil d'expression par rapport aux tissus sains (Zarour et al. 2003; Vigneron et al. 2013; Coulie et al. 2014). Un exemple de classification est présenté dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Classification des antigènes tumoraux.

Catégorie	Description	Exemples d'antigène	Références
Viral	Uniquement exprimé par les cellules tumorales suite à une infection virale responsable de l'oncogenèse	EBNA (EBV) p40x (HTLV) E6/E7 (HPV)	Murray <i>et al.</i> 1992 Koenig <i>et al.</i> 1993 van der Burg & Melief 2011
Néo-antigène	Uniquement exprimé par les cellules tumorales, mutation génétique ponctuelle se traduisant par un changement de la séquence d'acide aminés	CDK4 CASP-8 p53	Wolfel <i>et al.</i> 1995 Mandrizzato <i>et al.</i> 1997 DeLeo 1998
Germinal	Exprimé par les cellules tumorales et dans les organes liés à la reproduction chez les adultes	NY-ESO-1 GAGE family MAGE family	Chen <i>et al.</i> 1997 De Backer <i>et al.</i> 1999 Weon et Potts 2015
Différenciation	Expression restreinte à un type de tissu, exprimé par les cellules normales et tumorales qui dérivent de ce tissu	Tyrosinase gp100 MART-1	Brichard <i>et al.</i> 1993 Kawakami <i>et al.</i> 1994 Barker <i>et al.</i> 1995
Surexprimé	Exprimé dans les tissus sains, mais surexprimé par les cellules tumorales	HER2/neu WT1 MUC1	Fisk <i>et al.</i> 1995 Inoue <i>et al.</i> 1997 Vlad <i>et al.</i> 2004

HPV : *human papillomavirus*, EBV : *Epstein-Barr virus*, HTLV : *human T-lymphotropic virus*

Deux catégories d'antigènes sont capables d'induire une réponse immunitaire strictement dirigée contre les cellules tumorales : les antigènes viraux, exprimés par les cancers dont une infection virale est à l'origine de leur transformation, et les néo-antigènes, issus de mutations génétiques ponctuelles dans des exons. Les trois autres types d'antigènes ne sont pas spécifiques des tumeurs et sont produits par d'autres tissus

comme les cellules germinales (TAA germinal), les tissus somatiques sains (TAA de différenciation), ou exprimés à des taux plus faibles dans les cellules normales (TAA surexprimé). Les antigènes non spécifiques des tumeurs sont codés par des gènes dont l'expression a été ré-activée ou sur-activée suite à des modifications épigénétiques ou des mutations au niveau de leur promoteur. L'utilisation de ces catégories d'antigènes en immunothérapie doit donc être considérée avec précaution en raison de la probabilité d'induire des réactions auto-immunes (cf. **§B.1.4**, Introduction).

Afin de pouvoir différencier les cellules saines des cellules cancéreuses, le système immunitaire est donc capable de reconnaître des TAA et de détruire les cellules qui l'expriment. Les TAA sont libérés dans l'environnement tumoral suite à la mort des cellules tumorales qui peut être induite (chimio-, radiothérapie) ou naturelle (réponse immunitaire, apoptose) (**Figure 1, étape 1**). Ces antigènes seront captés et endocytés par les cellules dendritiques (DC), qui sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) spécialisées (**Figure 1, étape 2**).

2.2. Maturation et présentation des antigènes par la cellule dendritique

2.2.1. *Les sous-populations de cellules dendritiques*

Les DC sont les principales cellules sentinelles de notre organisme, en charge de la surveillance des tissus et de la recherche de pathogènes, cellules infectées, mortes ou anormales. Ces cellules sont spécialisées dans la récupération d'antigènes et leur présentation aux lymphocytes T naïfs pour déclencher une réponse immunitaire adaptée au danger détecté. Il existe deux grandes classes de cellules dendritiques, les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC conventionnelles (cDC). Cette dernière catégorie comprend de nombreux sous-types cellulaires qui se différencient selon leur fonctionnalité et leur expression de marqueurs de surface et/ou facteurs de transcription (Shortman & Liu 2002) (**Figure 2**).

Les pDC ont été décrites comme ayant un rôle immunomodulateur, permettant d'orienter la réponse immunitaire en sécrétant de grande quantité d'interférons de type I lors d'une infection virale. Leur capacité à présenter des antigènes est controversée (Villadangos & Young 2008) et leur présence dans l'environnement tumoral est corrélée avec un mauvais pronostic (Demoulin et al. 2013). Au contraire, les cDC jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire antitumorale car ce sont les seules CPA capables

de réaliser le processus de « cross-présentation », qui est indispensable pour présenter les TAA aux lymphocytes T CD8⁺ (cf. §A.2.2.3, Introduction). Même si toutes les CPA possèdent la machinerie cellulaire permettant de réaliser la cross-présentation, deux populations sont plus aptes à réaliser ce mécanisme : les CD8 α^+ cDC résidentes et les CD103⁺ cDC migratoires (Segura & Amigorena 2015). En effet, les cDC exprimant le facteur de transcription Batf3 sont plus efficaces pour internaliser les antigènes par endocytose et surexpriment les gènes impliqués dans la voie de présentation d'antigènes exogènes. Ces cellules limitent également la dégradation des antigènes dans l'endosome

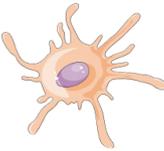
		cDC					
		Résidentes			Migratoires		
							
Sous-population		pDC	CD8 α^+ DC	CD8 α^- DC	CD103 ⁺ DC	CD103 ⁻ DC	Cellule de Langerhans
Localisation	Sang et rate	Organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques,...)			Tissu périphérique, derme, organes non lymphoïdes		Epiderme et muqueuses
Facteur de transcription			<i>Batf3</i>	<i>IRF4</i>	<i>Batf3</i>	<i>IRF4</i>	
Marqueur murin	CD11c Ly6C B220 PDCA.1 TLR7/TLR9	CD11c CD8 α XCR1	CD11c CD11b CD172a	CD11c CD103 CCR7 XCR1 Langerin	CD11c CD11b CCR7 CD172a	CD11c Langerin CCR7 Epcam E-cadherine	
Marqueur humain	CD123 CD303/BDCA2 CD304/BDCA4	CD11c CD141 Clec9A XCR1	CD11c CD11b CD1c CD172a	CD11c CD141 Clec9A XCR1 CD1a CD14	CD11c CD11b CD206 CD1c CD172a	CD11c Langerin Epcam E-cadherine	
Cross-présentation	Non	Oui	Non	Oui	Oui / Non	Non	



Figure 2. Les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines.

Cette figure présente les différents types de DC, leur localisation, les marqueurs de surface permettant de les différencier chez la souris et chez l'Homme et leur habilité à réaliser la cross-présentation.

en maintenant un pH alcalin, permettant une cross-présentation optimale des peptides (Gardner et Ruffell 2016). Plusieurs études ont confirmé l'importance de ces deux types cellulaires pour la réponse antitumorale *in vivo* chez la souris et chez l'Homme (Haan et al. 2000; Edelson et al. 2010; Segura & Amigorena 2014; Wylie et al. 2015).

2.2.2. *Maturation des cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques possèdent deux états qui leur confèrent des capacités différentes : immature ou mature (Mellman & Steinman 2001). Les DC immatures sont très aptes à internaliser les antigènes mais sont incapables de présenter efficacement ces antigènes aux lymphocytes T. En effet, l'apprêtement des TAA et leur présentation à la surface des DC nécessitent que celles-ci évoluent d'un stade immature à mature.

La capture des antigènes a lieu pendant le stade immature des DC. Suite à la libération d'exosomes, de corps apoptotiques ou de molécules solubles, les TAA sont captés par les cDC présentes dans l'environnement tumoral qui vont les internaliser par endocytose, macropinocytose ou phagocytose (Palucka & Coussens 2016). Les antigènes solubles peuvent également être drainés par le système lymphatique puis amenés jusqu'aux organes lymphoïdes par les DC circulantes de la lymphe. Dans des conditions physiologiques, la maturation des DC a lieu quasiment au même moment que leur rencontre avec les antigènes, permettant leur conversion d'un stade immature apte à capter des antigènes, à un stade mature spécialisé dans la stimulation des lymphocytes T en moins de 24h.

La maturation des DC a généralement lieu suite à la perception de motifs moléculaires associés aux micro-organismes (*microbe-associated molecular pattern*, MAMP) par l'intermédiaire des récepteurs de la famille des PRR (*pattern-recognition receptor*), comme les récepteurs Toll-like ou Nod-like (TLR et NLR, respectivement). Dans un contexte tumoral, les DC reconnaissent par l'intermédiaire de leur PRR des signaux de dangers qui sont des molécules excrétées par les cellules mourantes ou stressées (DAMP, *damage-associated molecular pattern* : ATP, HMGB1, calréticuline). Les DC peuvent aussi être activées par des cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules en état de stress cellulaire (TNF- α , IL-6, IL-18). Les PRR et leur utilité dans le cadre de l'immunothérapie des cancers seront davantage décrits dans le §**B.3.3.2** de l'introduction. Tout en réalisant leur maturation, les DC vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et augmenter leur expression de différentes molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40), de chimiorécepteurs (CCR4, CCR7) et leur production de cytokines (IL-6, IL-12,

IFN de type 1). Lors de la migration, les DC vont également entamer le processus d'apprêtement des antigènes à leur surface (Mellman 2013).

2.2.3. *Apprêtement de l'antigène*

Suite à l'internalisation des TAA et pendant la maturation des DC, les antigènes de type protéique sont dégradés pour être présentés sous la forme de peptides appelés « épitopes peptidiques » associés aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Il existe deux voies classiques permettant la présentation de peptides à la surface des DC : i) la voie extrinsèque qui prend en charge les peptides extracellulaires, internalisés par endocytose puis présentés sur le CMH de classe II (CMH-II) aux lymphocytes T CD4⁺ et ii) la voie intrinsèque permettant la présentation de peptides provenant du cytosol, issus de protéines ou pathogènes intracellulaires, qui seront présentés sur le CMH de classe I (CMH-I) aux lymphocytes T CD8⁺.

Dans le cas de la réponse antitumorale, les TAA proviennent exclusivement du milieu extracellulaire mais doivent pourtant être présentés aux lymphocytes T CD8⁺, qui après différenciation en cellules cytotoxiques, seront responsables de la destruction des cellules tumorales. Pour permettre l'apprêtement d'épitopes peptidiques exogènes sur le CMH-I, certains types de DC sont capables de réaliser un processus appelé « cross-présentation » (Joffre et al. 2012). Les trafics cellulaires des TAA sont schématisés dans la **Figure 3**, qui présente la voie prédominante pour la cross-présentation d'antigènes exogènes, appelée voie cytosolique. Ce mécanisme permet aux antigènes internalisés d'échapper aux vésicules d'internalisation (endosome, phagosome ou lysosome) et de rejoindre la machinerie cytosolique impliquée dans la voie intrinsèque d'apprêtement de l'antigène. Il existe également une voie vacuolaire où les antigènes sont directement dégradés par des protéases dans l'endosome, qui va ensuite fusionner avec une vésicule contenant le CMH-I (Palmowski et al. 2006). Récemment, un nouveau mécanisme a été décrit permettant à la DC de présenter des épitopes tumoraux associés au CMH-I : le « cross-dressing » (Campana et al. 2015). Lors de ce processus, les DC récupèrent directement des fragments de membranes cytoplasmiques portant des complexes peptide-CMH préformés, qui proviennent d'autres CPA, de cellules tumorales ou bien d'exosomes excrétés par ces deux cellules (Théry et al. 2009).

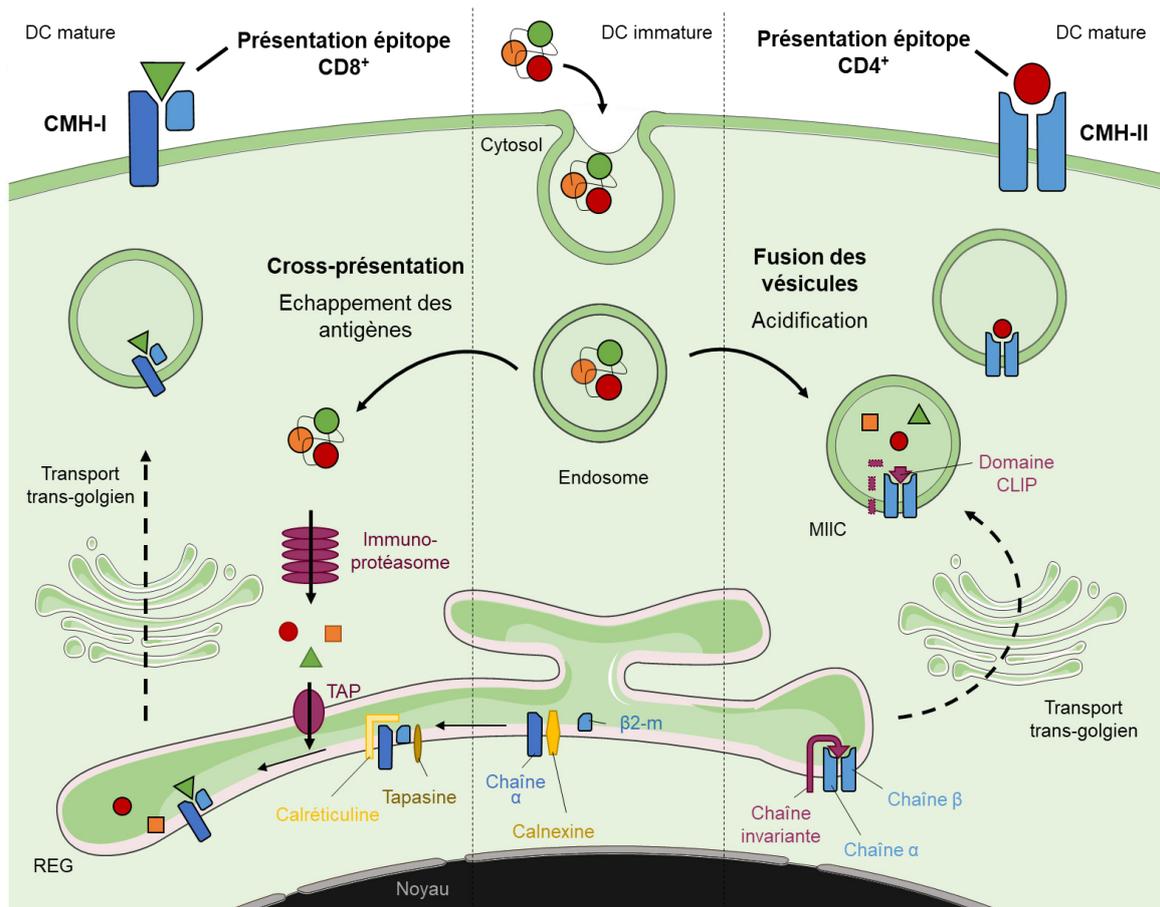


Figure 3. Cross-présentation des antigènes tumoraux par une cellule dendritique.

Après l'internalisation des antigènes exogènes par la DC immature, ceux-ci peuvent être transférés de l'endosome jusqu'au cytosol, où ils seront dégradés par l'immunoprotéasome. Les peptides, ainsi découpés, sont transportés par la protéine TAP dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG), où ils seront associés au CMH-I. Alternativement, les antigènes peuvent également être dégradés dans l'endosome qui va fusionner avec une vésicule acidifiée contenant le CMH-II bloqué par le domaine CLIP. Les peptides affins vont remplacer CLIP dans la poche peptidique avant d'être présentés à la surface associés au CMH-II. D'après Joffre et al. 2012; Villadangos and Schnorrer 2007.

Les TAA sont présentés sous la forme d'épitopes peptidiques associés au CMH-I ou CMH-II selon leur affinité pour la poche peptidique du complexe. En général, les peptides associés au CMH-I sont courts (8-10 acides aminés) alors que la poche peptidique du CMH-II est ouverte permettant la liaison de peptides plus longs (13-15 acides aminés).

Lors de sa migration, la DC mature va rejoindre les manchons péri-artériolaires de la rate ou la zone corticale des ganglions lymphatiques où elle va présenter à sa surface des peptides tumoraux associés au CMH-I ou CMH-II, reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ respectivement (**Figure 1, étape 3**).

2.3. Reconnaissance antigénique et différenciation des lymphocytes T

Bien que la présentation des peptides à la surface des DC se fassent simultanément sur le CMH-I et CMH-II, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ a lieu de manière séquentielle autour de la DC (Kenneth Murphy 2011). Cette coordination entre ces trois cellules immunitaires est communément appelée le « ménage à trois » (**Figure 4**).

2.3.1. *Activation des lymphocytes T helper*

Les lymphocytes T naïfs se trouvent dans les zones T ou paracorticales des organes lymphoïdes secondaires, où ils se déplacent et se fixent transitoirement à chaque DC rencontrée (Charles A Janeway et al. 2001). Lorsqu'un lymphocyte T CD4⁺ naïf reconnaît spécifiquement un complexe peptide-CMH-II présenté par une DC, celui-ci va alors se différencier en lymphocyte T CD4 spécialisé, appelé T helper (**Figure 4, étape 1**). Certains signaux de costimulation exprimés par la DC vont permettre une meilleure activation des lymphocytes T CD4⁺, tels que la liaison du CD80/CD86 au CD28 et la production de cytokines. Dans le cas de la réponse antitumorale, les cytokines produites par la DC (IL-12, IFN- γ) orienteront la différenciation et la prolifération de lymphocytes T helper 1 (Th1) (Walsh & Mills 2013). Ce sous-type cellulaire est également impliqué dans le contrôle des infections dues à des pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, parasites) et est caractérisé par une forte production d'IFN- γ .

2.3.2. *Différenciation des lymphocytes T cytotoxiques*

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) sont capables de détruire directement les cellules infectées ou anormales par reconnaissance de peptides antigéniques présentés sur le CMH-I. En raison de leurs activités effectrices cytotoxiques, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs ont besoin d'un plus grand nombre de signaux de costimulation pour se différencier (**Figure 4, étape 2**). La différenciation des CTL nécessite la présence de Th1 différenciés qui vont aider à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en interagissant avec la cellule dendritique. En effet, la production d'IFN- γ par le Th1 et la liaison du CD40-L exprimé par cette cellule à son récepteur CD40 sur la DC vont permettre l'augmentation de l'expression du CMH-I et des molécules de costimulation par la cellule dendritique. Suite à la perception de trois signaux (reconnaissance du complexe peptide-CMH-I, liaison du CD28 aux CD80/CD86 et présence d'IL-2 produite par les Th1), les lymphocytes T CD8⁺ naïfs vont se différencier en CTL. Ces cellules seront

capables de détruire spécifiquement les cellules tumorales qui expriment le même peptide tumoral associé au CMH-I en induisant leur mort par apoptose (**Figure 4, étape 3**).

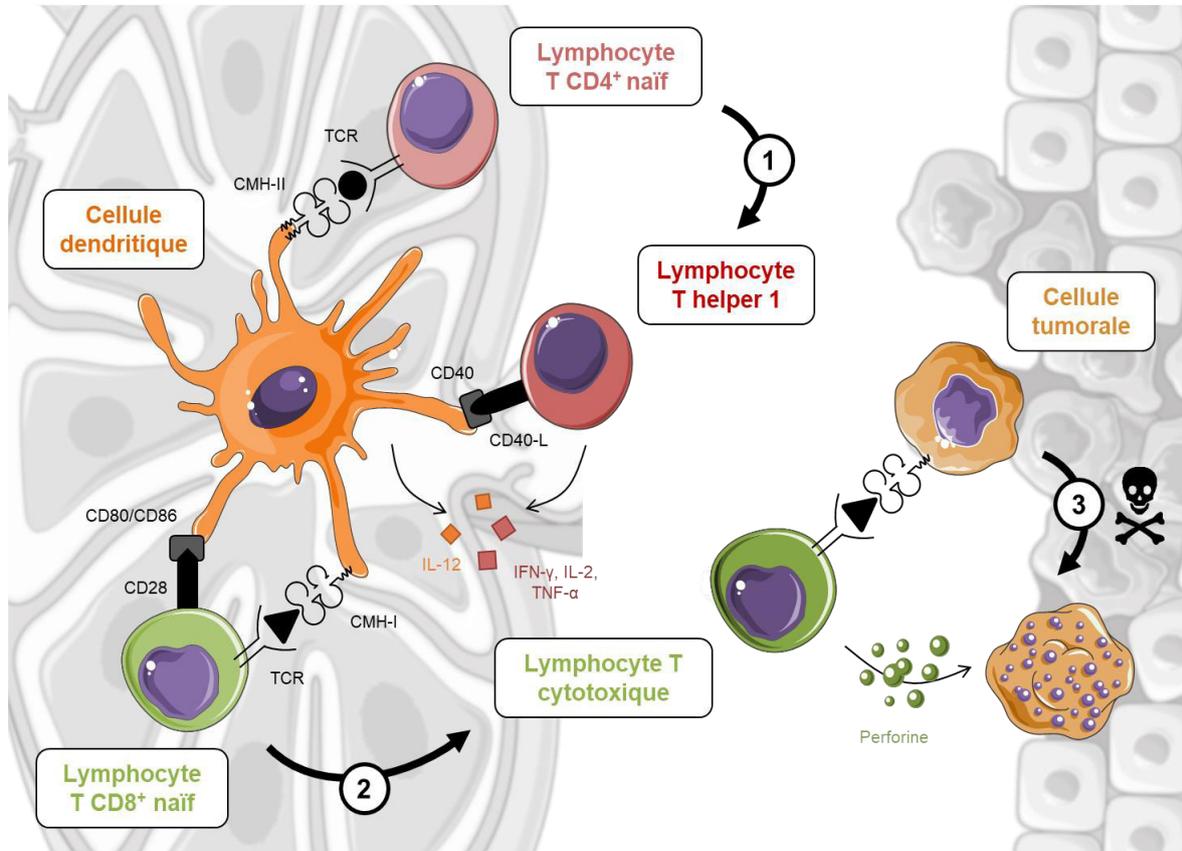


Figure 4. Réponse immunitaire cytotoxique.

Les lymphocytes T reconnaissent à la surface des DC des peptides tumoraux associés au CMH par l'intermédiaire de leur TCR. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th1 a lieu en premier (1), suivi de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en CTL (2) qui seront capables de détruire spécifiquement les cellules tumorales (3).

TCR : *T-cell receptor*, Th : lymphocyte T helper, CTL : cytotoxic T-lymphocyte.

2.4. Destruction des cellules tumorales

Suite à leur différenciation, les lymphocytes T cytotoxiques vont quitter l'organe lymphoïde secondaire et rejoindre la circulation sanguine afin de migrer jusqu'à la tumeur (**Figure 1, étape 4**). Dès leur arrivée sur le site tumoral, les CTL vont traverser l'endothélium par un phénomène appelé diapédèse impliquant l'activité de plusieurs molécules d'adhésion cellulaire, de chimiokines et de chimiorécepteurs (**Figure 1, étape 5**). Une fois dans le tissu tumoral, les lymphocytes vont « scanner » les cellules tumorales

à la recherche de complexe peptide-CMH-I identique à celui qui leur avait été présenté par la DC. Une fois ce complexe reconnu, le CTL va s'arrêter en face de la cellule tumorale et former une synapse immunologique (**Figure 1, étape 6**), permettant une polarisation du cytosquelette et un relargage ciblé de molécules effectrices qui vont contribuer à la lyse des cellules tumorales (**Figure 1, étape 7**).

Les lymphocytes T cytotoxiques induisent la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules cancéreuses de deux manières différentes : i) par relargage de granules cytotoxiques (perforine, granzyme, granulysine) qui vont pénétrer la cellule tumorale et stimuler l'apoptose, ou ii) par l'expression de ligands de mort (Fas-L, CD40-L, TRAIL, TNF- α) qui vont se lier à leur récepteur respectif situé à la surface des cellules tumorales (CD95, CD40, TRAIL-R, TNFR-I) et induire également une cascade signalétique responsable de la mort des cellules tumorales.

3. Autres cellules immunitaires impliquées dans la lutte antitumorale

Le processus ci-dessus a été décrit comme le principal mécanisme responsable de la destruction des cellules tumorales (Palucka & Coussens 2016). En dehors de l'implication de la réponse immunitaire cytotoxique, d'autres types cellulaires peuvent également jouer un rôle important ou minoritaire dans la lutte antitumorale (Pluhar et al. 2015).

Dans le cas des cancers, la croissance tumorale et l'angiogenèse des tissus vont provoquer des lésions au niveau des tissus induisant une inflammation localisée à l'origine du recrutement de cellules de l'immunité innée. Neutrophiles, macrophages, DC et lymphocytes de l'immunité innée (cf. §A.3, Introduction) vont initier l'élimination des tumeurs et produire de l'IFN- γ qui va participer à la polarisation de DC pro-Th1 (Dunn et al. 2002). Cette première ligne de défense de notre corps, bien qu'ayant un pouvoir destructeur limité, est indispensable pour l'initiation de la réponse immunitaire antitumorale et l'activation de l'immunité adaptative, plus efficace et spécifique.

3.1. Les cellules NK

Au cours des multiples mutations se produisant dans le génome des cellules tumorales, celles-ci peuvent perdre leur capacité à présenter des antigènes, leur expression du CMH-I ou de molécules de costimulation, rendant impossible leur détection par les lymphocytes T cytotoxiques (Garrido et al. 2016). Les tumeurs ayant perdu

l'expression du CMH-I peuvent cependant être détruites par un sous-type particulier de lymphocytes appelé natural killer (NK) (Waldhauer & Steinle 2008; Nicholson et al. 2017).

Ces cellules lymphoïdes de l'immunité innée possèdent des activités effectrices similaires aux lymphocytes T. Elles produisent de l'IFN- γ , du TNF- α et ont les mêmes propriétés lytiques que les CTL mais sont incapables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales car elles ne possèdent pas de TCR. Afin de distinguer les cellules saines des cellules anormales ou stressées, les NK expriment des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui se lient à des ligands exprimés par leur cellule-cible (**Figure 5**). Les cellules saines ne sont pas attaquées par les NK car elles expriment peu de molécules liées au stress et présentent des molécules du soi (tel que le CMH-I) à leur surface qui vont se lier à un récepteur inhibiteur (famille des récepteurs KIR chez les humains, Ly49, NKG2A chez la souris) (**Figure 5A**, tolérance). Au contraire, les cellules tumorales sont

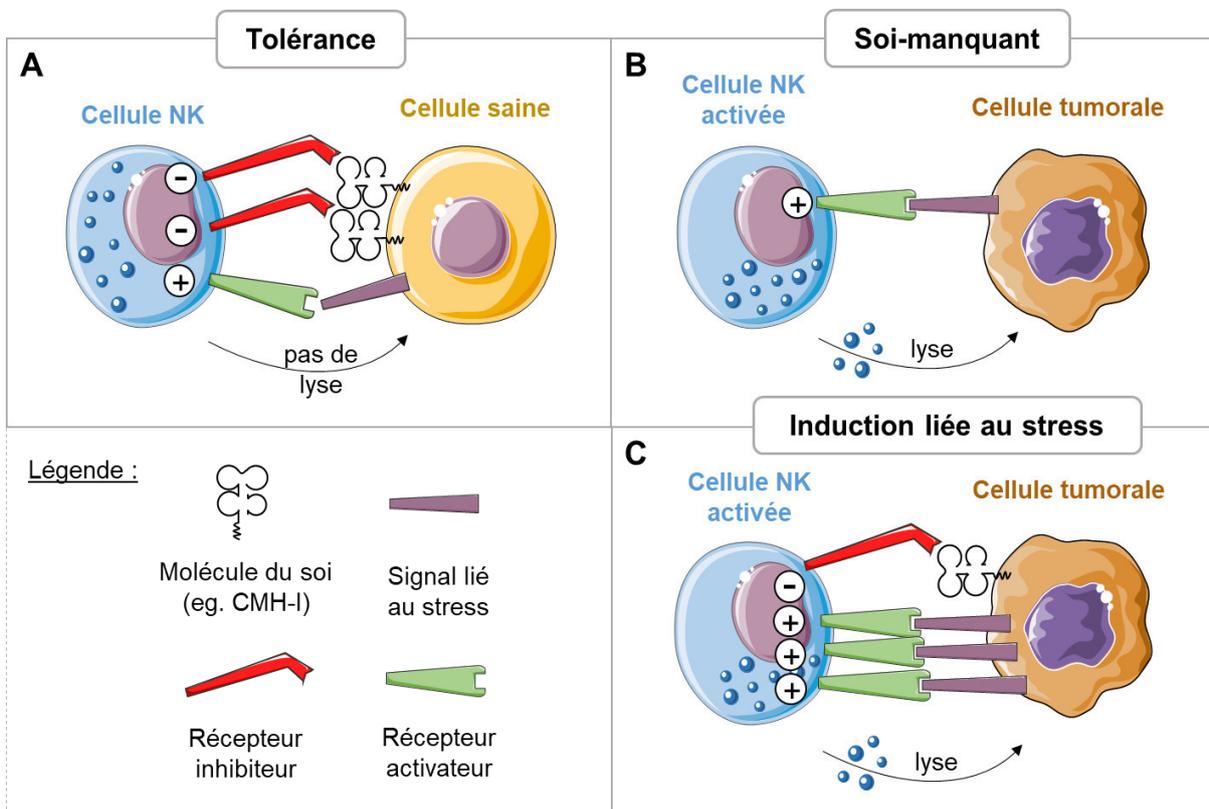


Figure 5. Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules « natural killer ».

(A) Les NK ne réagissent pas contre les cellules saines, qui émettent peu ou pas de signaux activateurs et portent des molécules du soi se liant aux récepteurs inhibiteurs. (B) Certaines cellules tumorales perdent l'expression des molécules du soi, dont le CMH-I, suite à une mutation génique. Ce « soi-manquant » est responsable de l'activation des NK qui ne perçoivent plus de signaux inhibiteurs. (C) Les NK peuvent également être activées par des cellules « stressées » qui surexpriment des signaux activateurs permettant de surmonter le signal inhibiteur émis par les molécules du soi. D'après (Vivier et al. 2012).

reconnues par les NK grâce à deux mécanismes : i) l'absence de molécule du soi (**Figure 5B**, soi-manquant) et ii) la surexpression de molécules liées au stress (MICA, MIC, H60 et MULT1) qui vont se lier à des récepteurs activateurs (NKG2B, famille des NCR, DNAM1) (**Figure 5C**, induction liée au stress). La résultante des différents signaux activateurs et répresseurs permettra d'induire la mort de la cellule-cible par relargage de granules cytotoxiques ou liaison à des ligands de mort, lorsque la balance penche vers une activation de la cellule NK (Vivier et al. 2012).

Les cellules NK peuvent également détruire les cellules tumorales qui ont été ciblées par des anticorps se liant à leur TAA membranaire. Les NK reconnaissent la partie Fc des anticorps grâce à son récepteur CD16 (FcγRIII). Ce processus est appelé ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) et nécessite qu'une réponse humorale (activation des lymphocytes B, différenciation des plasmocytes, production d'anticorps dirigés contre la tumeur) ait eu lieu au préalable (Murphy et al. 2012; Tsou et al. 2016). Ce mécanisme est cependant minoritaire dans la majorité des cancers, mis à part dans le cas où les patients ont reçu comme traitement des anticorps monoclonaux dirigés contre un marqueur tumoral (Strohl & Strohl 2012; Wang et al. 2015).

3.2. Les cellules NKT

Deux autres sous-types cellulaires exprimant un TCR invariant et capables de reconnaître des antigènes présentés par le CD1d, ont également été décrits comme impliqués dans la réponse antitumorale : les lymphocytes NKT et T gamma delta ($\gamma\delta$).

Bien qu'exprimant certains marqueurs des NK, les lymphocytes NKT possèdent des fonctions effectrices plus proches des lymphocytes CTL et réagissent principalement à la reconnaissance d'un antigène lipidique présenté sur le CD1d des DC. Pendant de nombreuses années, le seul antigène connu pour sa liaison au CD1d était le glycosphingolipide α -GalCer extrait à partir d'une éponge de mer puis synthétisé sous le nom KRN7000. Plusieurs antigènes endogènes ont depuis été découverts, dont le disialoganglioside GD3 qui est surexprimé dans certains types de cancers du poumon, des mélanomes ou des glioblastomes (Wu et al. 2003; Park et al. 2008). La reconnaissance d'antigènes lipidiques associés au CD1d à la surface des cellules tumorales permet d'activer les NKT qui, comme les CTL, vont pouvoir lyser spécifiquement les cellules tumorales (Krijgsman et al. 2018).

En dehors de leur activité lytique directe contre les cellules tumorales, ces cellules produisent également de grandes quantités de cytokines qui vont induire la maturation des DC exprimant le CD1d. Selon le type de stimulation, l'environnement immunitaire et leur localisation, les NKT peuvent produire de l'IFN- γ (Th1), de l'IL-4 (Th2), de l'IL-17 (Th17) et de l'IL-10 (Treg). Ces cellules sont également capables de recruter, sur le site de la tumeur, des lymphocytes NK et CTL (Terabe & Berzofsky 2014). Grâce à ces deux dernières fonctions, les NKT se retrouvent à l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative, faisant de ces cellules des cibles idéales dans le cadre de l'immunothérapie.

En effet, différentes études précliniques ont cherché à exploiter l' α -GalCer, qui va induire la production de grande quantité d'IFN- γ par les NKT, et agira comme un adjuvant en (ré)activant la réponse immunitaire antitumorale (Ghinnagow et al. 2017; Wolf et al. 2018). Suite au succès de plusieurs études sur la souris contre différents types tumoraux, l' α -GalCer a ensuite été évalué en injection i.v. chez des patients atteints de stade avancé de cancer du poumon ou de la tête et du cou (Waldowska et al. 2017). Malheureusement, ce type de traitement a montré une très faible efficacité clinique, potentiellement due à une diminution quantitative et qualitative des NKT chez des individus portant une tumeur. De nouvelles stratégies pour améliorer l'immunogénicité de l' α -GalCer sont en cours d'évaluation, il a par exemple été proposé de réaliser des transferts adoptifs de NKT ou de DC activés *ex vivo* par cette molécule (Chang et al. 2005; Yamasaki et al. 2011), ou d'associer l' α -Galcer (avec ou sans TAA) à des vecteurs pour mieux contrôler sa délivrance (Ghinnagow et al. 2017).

D'après la littérature, le rôle des NKT est cependant controversé, les deux sous-types de NKT (type I ou II) pouvant jouer un rôle dans l'immunosurveillance des tumeurs mais également être immunosuppresseurs (Godfrey & Kronenberg 2004; Berzofsky & Terabe 2008).

3.3. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ combinent les activités cytotoxiques des CTL (relargage de granules cytotoxiques, ligands de mort, production de cytokines) et les propriétés innées des NK leur permettant de reconnaître des molécules liées au stress. Ces cellules sont également capables de recruter ou d'activer différents sous-types immunitaires et peuvent jouer le rôle de CPA en présentant des antigènes sur le CMH-I et CMH-II, leur permettant

d'activer les lymphocytes $T\alpha\beta$ classiques (Zou et al. 2016). Comme les NKT, les lymphocytes $T\gamma\delta$ possèdent deux sous-types cellulaires qui ont un effet anti- ou protumoral (Fleming et al. 2017; Zhao et al. 2018).

4. De l'élimination à l'échappement tumoral

4.1. Les trois phases de la progression tumorale

Chaque jour, plusieurs mutations génétiques sont conservées dans notre organisme, qui peuvent donner naissance à une cellule tumorale. Grâce à l'immunosurveillance des tumeurs, de nombreuses cellules anormales sont éliminées, permettant de prévenir l'apparition de tumeurs. Cependant, l'accumulation des mutations ou l'établissement de mécanismes immunosuppresseurs peuvent permettre aux cellules cancéreuses d'échapper au contrôle immunitaire et de proliférer de manière incontrôlée. L'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales est un processus dynamique complexe qui se décompose en trois phases : élimination, équilibre et échappement (Dunn et al. 2004a) (**Figure 6**).

4.1.1. *Elimination*

La phase d'élimination des tumeurs correspond au concept classique de l'immunosurveillance des tumeurs. Lors de cette phase, de nombreuses cellules appartenant à l'immunité innée ou adaptative, décrites précédemment (§A.2 et A.3, Introduction), agissent de concert pour permettre la destruction de toutes les cellules tumorales (Dunn et al. 2004b). Le modèle principal qui a été retenu pour décrire l'enchaînement des événements immunologiques de cette première étape est le suivant : i) initiation de la réponse par les cellules de l'immunité innée (cellules NKT, NK et lymphocytes $T\gamma\delta$), ii) production d'IFN- γ et recrutement de NK, DC, macrophages sur le site de la tumeur, iii) internalisation des TAA par les DC qui migrent jusqu'aux organes lymphoïdes, iv) contrôle de la croissance tumorale par les NK et les macrophages pendant que les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ spécifiques de la tumeur se différencient, v) infiltration de la tumeur par les CTL et destruction spécifique des cellules tumorales exprimant les TAA (Visser et al. 2006). Malheureusement, ce système n'est pas infallible et certaines cellules tumorales échappent à la surveillance du système immunitaire.

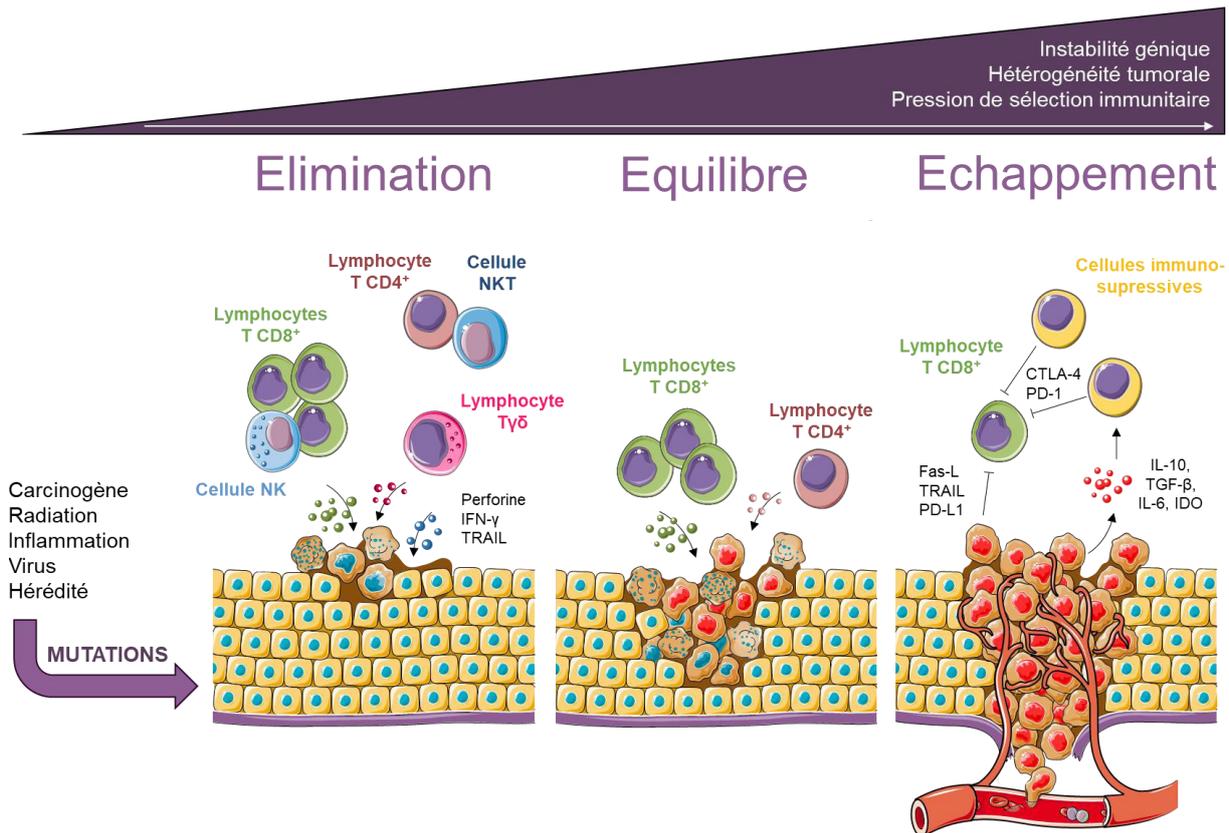


Figure 6. Les trois E de la progression tumorale.

Les cellules saines, exposées à des stimuli oncogènes, peuvent accumuler des mutations géniques responsables de leur transformation tumorale. Les cellules cancéreuses seront reconnues comme dangereuses et détruites par le système immunitaire lors de la phase d'élimination. Cependant, si l'élimination n'est pas totale, la tumeur rentre alors dans une phase d'équilibre où la prolifération des cellules est contenue par le système immunitaire qui progressivement participe à la sélection de cellules tumorales de plus en plus résistantes (noyau rouge). Ces cellules pourront se soustraire au contrôle par le système immunitaire et induire la formation d'une tumeur détectable cliniquement. D'après Burg et al. 2016; Dunn et al. 2004b; Visser et al. 2006.

4.1.2. Equilibre

Suite à la phase d'élimination, les cellules tumorales ayant échappé à l'immunosurveillance et les cellules immunitaires entrent dans une phase d'équilibre dynamique qui peut durer plusieurs années. Le système immunitaire maintient la tumeur dans un état de « dormance », où un équilibre se forme entre l'élimination continue des cellules tumorales et l'apparition de nouvelles cellules plus résistantes (Bhatia & Kumar 2011). Contrairement aux deux autres phases, seules les cellules immunitaires adaptatives sont impliquées dans l'état d'équilibre, induisant le maintien de la progression tumorale grâce à leur activité cytotoxique et leur forte production de cytokines de type Th1

(IFN- γ , TNF- α). Durant la phase d'équilibre, les cellules tumorales résistantes vont accumuler des mutations géniques leur permettant de mieux survivre à la pression du système immunitaire. Ces cellules pourront alors proliférer plus rapidement ou échapper à l'apoptose induite par le système immunitaire, amenant la tumeur à s'échapper de l'état d'équilibre (Mittal et al. 2014).

4.1.3. *Echappement*

L'échappement de la tumeur est l'étape finale où les cellules tumorales se sont totalement soustraites au contrôle par le système immunitaire et prolifèrent de manière incontrôlée. Elles vont alors former une tumeur primaire, qui va perturber certaines fonctions physiologiques induisant l'apparition de divers symptômes chez le patient. Les mécanismes d'échappement, qui débutent lors de la phase d'équilibre, peuvent provenir de différentes sources et apparaître à divers stades du développement tumoral (Dunn et al. 2002).

4.2. Mécanismes d'échappement tumoral

Dès la phase d'équilibre, le système immunitaire applique une pression de sélection sur les cellules tumorales, permettant l'élimination des cellules tumorales sensibles et le maintien des variants tumoraux agressifs, qui ont développé des mutations permettant d'échapper au système immunitaire. Ces cellules tumorales possèdent différentes caractéristiques leur conférant des avantages pour survivre et proliférer : résistance à l'apoptose, modification de leur antigénicité, influence sur le micro-environnement tumoral et immunosuppression (Teng et al. 2015). Ces mécanismes d'échappement peuvent être classés en trois catégories présentées dans la **Figure 7**.

4.2.1. *Réduction de la reconnaissance des tumeurs*

4.2.1.1. *Mécanismes inhérents aux cellules tumorales*

Les altérations géniques (perte chromosomique, mutation et défaut de la transcription) subies par les cellules tumorales peuvent affecter leur reconnaissance par le système immunitaire (**Figure 7A**). En effet, de nombreuses tumeurs développent un défaut d'expression du CMH-I (perte ou diminution) ainsi que des altérations du processus d'apprêtement antigénique (Algarra et al. 2004). Certaines cellules tumorales peuvent également perdre l'expression d'un ou de plusieurs antigènes tumoraux qui étaient

auparavant ciblés par le système immunitaire adaptatif (Khong & Restifo 2002). Dans tous les cas, ces anomalies géniques vont permettre aux cellules tumorales d'échapper à la reconnaissance et la lyse spécifique induite par les CTL. Les cellules tumorales peuvent également perdre leur capacité à être reconnues par les lymphocytes de l'immunité innée, tels que les NK, en n'exprimant plus de ligands activateurs liés au stress cellulaire (Groh et al. 2002).

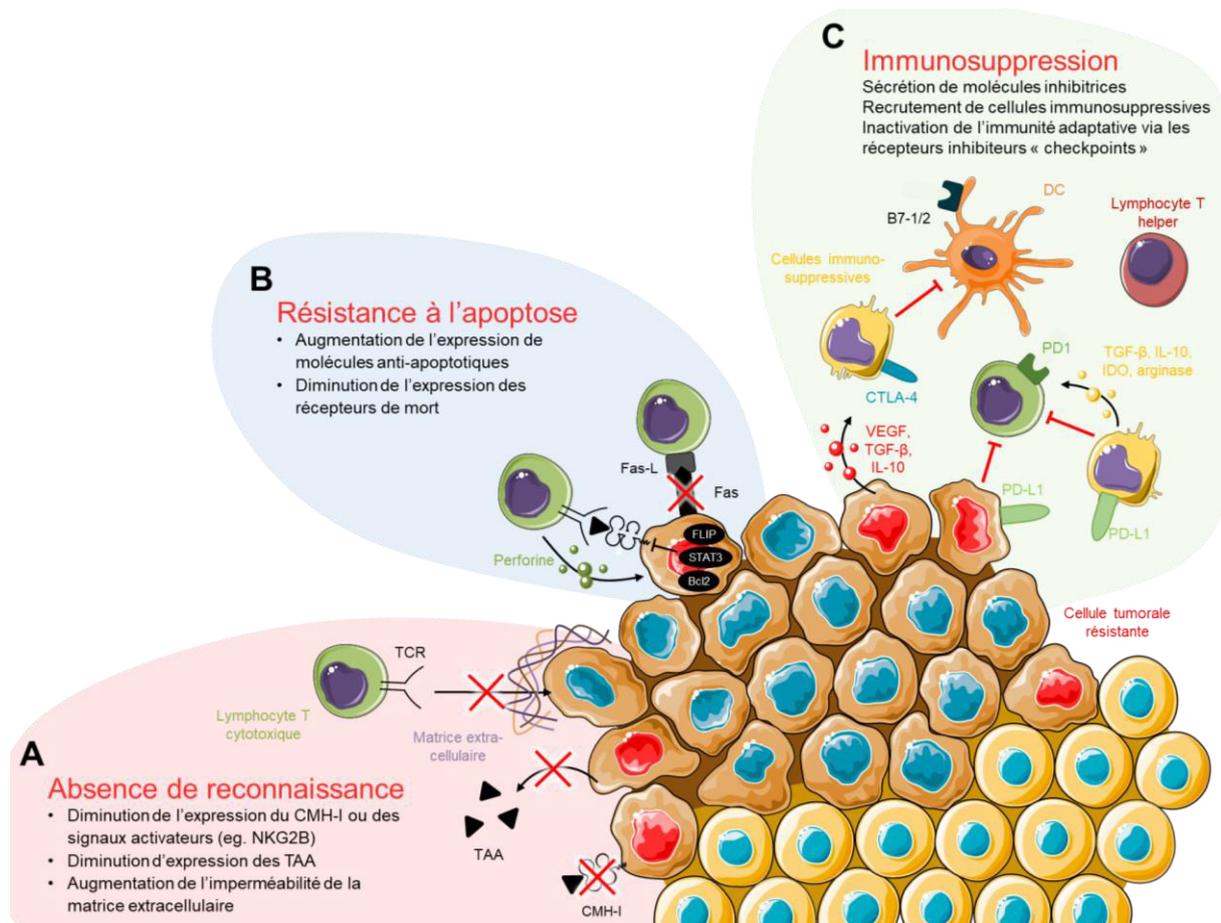


Figure 7. Mécanismes principaux d'échappement tumoral.

Les mécanismes de résistance de la tumeur contre le système immunitaire peuvent être classés en trois catégories : **(A)** absence de reconnaissance suite à une diminution d'antigénicité des cellules tumorales (diminution d'expression de TAA, du CMH-I, de molécules de co-stimulation) ou une imperméabilité de la matrice extracellulaire, **(B)** résistance à l'apoptose induite par les cellules cytotoxiques (STAT3), ou inhibition d'expression des récepteurs de mort et **(C)** établissement d'un environnement tumoral immunosuppresseur grâce à la production de cytokines (VEGF, TGF-β, IL-10), recrutement des cellules immunosuppressives (MDSC, Treg) ou inhibition du système immunitaire adaptatif suite à la liaison de récepteurs inhibiteurs « checkpoint » (PD-L1/PD1, B7/CTLA-4). D'après (Khong and Restifo 2002; Teng et al. 2015).

4.2.1.2. *Matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire se trouvant autour de la tumeur en croissance joue également un rôle important en facilitant la progression tumorale et l'apparition de métastases (Lu et al. 2012). Les cellules tumorales peuvent directement ou indirectement (par l'intermédiaire des cellules stromales, mésenchymateuses ou des fibroblastes) induire la formation d'une matrice extracellulaire anormale en terme de quantité, composition et d'organisation. Celle-ci va potentialiser l'oncogenèse et la survie des cellules tumorales (Paszek et al. 2005), l'invasion du tissu par la tumeur (Levental et al. 2009), favoriser l'angiogenèse (Myers et al. 2011) et représente une barrière physique qui empêche les cellules immunitaires d'accéder à la tumeur (Rowe & Weiss 2008).

4.2.2. *Résistance directe aux mécanismes effecteurs cytotoxiques*

Certaines tumeurs n'ont pas de défaut dans leur expression du CMH-I ou des ligands activateurs à leur surface, mais peuvent tout de même être résistantes directement aux mécanismes cytotoxiques induits par les CTL et les NK (**Figure 7B**). Par exemple, certaines cellules tumorales développent une insensibilité à l'IFN- γ (Castro et al. 2018), un défaut d'expression des récepteurs de mort TRAIL-R ou Fas (Igney & Krammer 2002) ou surexpriment des molécules anti-apoptotiques (STAT3, FLIP et Bcl2), qui empêchent l'induction de l'apoptose par les granzymes/perforines B (Yu et al. 2014). En outre, un mécanisme controversé qui a été décrit, serait la capacité des cellules tumorales à tuer directement les lymphocytes T en exprimant des ligands de mort (Fas-L, TRAIL) qui poussent les lymphocytes à se « suicider » par apoptose ou à tuer les autres cellules immunitaires autour d'eux par « fratricide » (Khong & Restifo 2002).

4.2.3. *Micro-environnement tumoral suppresseur*

4.2.3.1. *Production de cytokines immunosuppressives*

Les cellules tumorales produisent des facteurs de croissance ainsi que des molécules favorisant l'angiogenèse, comme le VEGF, le TGF- β , et l'IL-10, qui vont favoriser leur survie et leur croissance (Khong & Restifo 2002) (**Figure 7C**). Ces molécules et cytokines ont comme effets secondaires d'inhiber les cellules immunitaires effectrices, d'affecter la maturation des cellules dendritiques et d'induire le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives (cf. §A.4.2.3.2, Introduction).

Par exemple, le VEGF, en plus de son activité angiogénique, permet le recrutement de *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC), ainsi que de monocytes et macrophages associés à la tumeur ayant un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire (Bellamy et al. 2001). Le VEGF va également affecter négativement la différenciation et la maturation des DC en inhibant le facteur de transcription NF- κ B (Oyama et al. 1998). L'IL-10 agit elle-aussi sur la maturation des DC et inhibe leur production d'IL-12, altérant ainsi l'induction d'une réponse de type Th1 (Sharma et al. 1999). Le TGF- β produit par les cellules tumorales ou les cellules mourantes inhibe la prolifération et l'activation des lymphocytes T (Beck et al. 2001).

4.2.3.2. Recrutement des cellules immunosuppressives

Cet environnement immunosuppresseur initié par la tumeur permettra le recrutement et/ou l'activation de cellules immunitaires immunosuppressives qui vont renforcer l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale et permettre à la tumeur d'échapper au système immunitaire (Teng et al. 2015) (**Figure 7C**). Les cellules tumorales peuvent également induire un changement phénotypique des cellules immunitaires « normales », en déclenchant leur transition d'un état antitumoral vers un phénotype pro-inflammatoire ou immunosuppresseur.

Il existe différents types de cellules immunitaires immunosuppressives : les MDSC, les lymphocytes T régulateurs (Treg), les lymphocytes T helper de type 17 (Th17), les macrophages/monocytes et les neutrophiles protumoraux (de type M2 ou N2 respectivement). Ces cellules immunosuppressives partagent différents mécanismes d'action, qui ont été largement décrits dans plusieurs revues (Dunn et al. 2002; Khong & Restifo 2002; Smyth et al. 2006; Zitvogel et al. 2006; Liu & Cao 2016). Elles agissent en i) empêchant la maturation et l'expression des molécules de costimulation par les DC, ii) inhibant la prolifération et l'activation des lymphocytes T et iii) en empêchant le relargage de granules cytotoxiques par les cellules effectrices. Les cellules immunosuppressives induisent ces changements soit indirectement grâce à la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β) et de molécules immunorégulatrices (arginase, iNOS, IDO), soit directement par l'expression de ligands appelés « immune checkpoint »

4.2.3.3. Récepteurs inhibiteurs « checkpoint »

Lors d'une réponse immunitaire physiologique, les Treg et MDSC sont chargés de réguler négativement les lymphocytes T en se liant à leurs récepteurs inhibiteurs

« checkpoint », afin d'éviter l'induction d'une réponse inflammatoire délétère. Dans un contexte tumoral, ce mécanisme d'inhibition est amplifié, donnant lieu à une inactivation des CTL spécifiques de la tumeur (Korman et al. 2006; Pardoll 2012; Sharma & Allison 2015). Les cellules immunosuppressives expriment les ligands inhibiteurs PD-L1 et CTLA-4 qui vont se lier à leurs récepteurs PD-1 et B7-1/2, exprimés respectivement par les lymphocytes T ou les CPA (**Figure 7C**). La liaison de ces molécules va entraîner l'inhibition directe des lymphocytes T ou va interférer avec l'activation des lymphocytes T par les CPA. Certaines tumeurs inhibent également directement les CTL en exprimant le ligand PD-L1, permettant aux cellules tumorales d'échapper à la lyse cytotoxique (Dong et al. 2002). Récemment, d'autres ligands inhibiteurs, exprimés par les cellules tumorales ou les cellules immunosuppressives, ont été décrits comme capables d'inhiber la capacité des CTL à détruire les tumeurs (Tim-3, LAG-3, BTLA ; Liu and Cao, 2016). Tous ces mécanismes inhibiteurs sont très étudiés en tant que potentiels cibles thérapeutiques pour contrecarrer l'évasion des tumeurs et libérer la réponse immunitaire antitumorale réprimée (Chen & Mellman 2017).

Ainsi, notre organisme possède un système physiologique capable d'empêcher l'apparition des tumeurs mais qui n'est malheureusement pas infaillible. Une solution thérapeutique envisageable serait donc de réveiller la capacité innée de notre corps à combattre les cellules tumorales en stimulant/remplaçant les cellules immunitaires effectrices ou en inhibant les mécanismes immunitaires immunosuppresseurs. Cette stratégie est appelée « **Immunothérapie** ».

B. L'immunothérapie des cancers

Au XIX^{ème} siècle, un chirurgien américain nommé William Colley eut l'idée de traiter des patients atteints de sarcome en les infectant avec des lysats de streptocoques pathogènes (toxine de Colley, McCarthy 2006). Son postulat était que l'infection et l'inflammation déclenchées par la bactérie allaient avoir comme effet secondaire de réduire l'agressivité des tumeurs. Grâce à cette première utilisation historique d'une immunothérapie, il réussit à soigner plus de 1000 patients. Malheureusement, la technique fut discréditée par le scepticisme des médecins de l'époque et par l'émergence de la chimiothérapie et de la radiothérapie, si bien que l'idée de William Colley tomba dans l'oubli. Il faudra attendre plus d'un siècle pour que l'on confirme qu'une stimulation du système immunitaire peut conduire à une destruction des cellules tumorales et pour que cette approche thérapeutique soit de nouveau proposée aux patients atteints de cancer.

1. Différentes classes d'immunothérapie

1.1. Objectifs et actualités thérapeutiques

L'objectif de l'immunothérapie est de tirer profit des défenses immunitaires en les stimulant ou en les imitant afin d'engendrer la destruction spécifique des cellules tumorales. Pendant plusieurs décennies, les immunologistes et oncologistes ont fait face à de nombreuses déceptions, mais tous ces efforts ont finalement commencé à porter leurs fruits car cinq catégories de traitements immunothérapeutiques ont déjà été approuvées par la « Food and Drug administration » (FDA ; Mellman et al. 2011). Avec plus d'une quinzaine d'agents thérapeutiques sur le marché, dont la majorité développée il y a moins de 10 ans, l'immunothérapie est une stratégie antitumorale qui n'a plus besoin de faire ses preuves (Lesterhuis et al. 2011; Couzin-Frankel 2013). Ces dernières années ont effectivement vu l'émergence de nouvelles thérapies innovantes ayant suscité l'engouement public et scientifique, qui ont battu des records de vitesse en terme de développement, d'évaluation clinique et de mise sur le marché (Jardim et al. 2017).

Une liste des différentes immunothérapies actuellement commercialisées est présentée dans le **Tableau 2** (Adams & Weiner 2005; Kirkwood et al. 2012; Pardoll 2012; FDA-approval 2018). Les agents thérapeutiques présents dans cette liste sont utilisés en monothérapie et préconisés pour le traitement de plus de 10 types de cancer différents ;

ce sont en grande majorité des anticorps monoclonaux ciblant un TAA ou ciblant un récepteur inhibiteur des « checkpoint » immunitaires.

Tableau 2. Liste des immunothérapies déjà sur le marché.

Catégorie	Date d'approbation de la FDA	Agent thérapeutique	Types de cancer
Cytokines	1986	IFN- γ	Tricholeucémie, mélanome
	1998	IL-2	Carcinome rénal, mélanome
Anticorps monoclonaux	1997	Rituximab (@CD20)	Lymphome non hodgkinien (LNH), leucémie lymphoïde chronique (LLC)
	1998	Trastuzumab (@HER2)	Cancer du sein, de l'estomac, de l'œsophage
	2001	Alemtuzumab (@CD52)	LLC de type B ou T
	2004	Bevacizumab (@VEGF)	Cancer du poumon « non à petites cellules » (CPNPC), glioblastome, carcinome rénal, cancer colorectal, du col de l'utérus, ovarien
	2004	Cetuximab (@EGFR)	Cancer colorectal, cancer de la tête et du cou
	2006	Panitumumab (@EGFR)	Cancer colorectal métastatique
	2009	Ofatumumab (@CD20)	LLC
	2014	Ramucirumab (@VEGFR2)	Cancer colorectal, de l'estomac, CPNPC
Vaccin thérapeutique	2010	Sipuleucel-T (antigène PAP)	Cancer de la prostate
Checkpoint inhibiteurs	2011	Ipilimumab (@CTLA-4)	Mélanome
	2014	Pembrolizumab (@PD-1)	Mélanome
	2015	Nivolumab (@PD-1)	CPNPC métastatique
	2016	Avelumab (@PD-L1)	Carcinome à cellules de Merkel métastatique
	2016	Atezolizumab (@PD-L1)	Carcinome rénal, CPNPC, LNH, mélanome
	2017	Durvalumab (@PD-L1)	Cancer de la vessie métastatique
Transfert adoptif (CAR-T)	2017	Tisagenlecleucel (épitope CD19)	LNH, leucémie aiguë lymphoblastique de type B (enfant)
	2018	Axicabtagene ciloleucel (épitope CD19)	Lymphomes B (adulte)

@ : anticorps

1.2. Classification des immunothérapies

Il existe différents types d'immunothérapie qui interagissent avec le système immunitaire inné ou adaptatif, entraînant une réponse immunitaire spécifique ou généralisée. Ces stratégies ont été classées de différentes manières, plus ou moins discutables et pertinentes, au fur et à mesure des inventions thérapeutiques de cette

dernière décennie. L'une de ces classifications est présentée ci-dessous, accompagnée de tableaux décrivant les méthodes, leurs modes d'action et leurs désavantages.

1.2.1. Immunothérapie non spécifique

L'immunothérapie non spécifique consiste à activer de manière générale l'ensemble du système immunitaire ou une de ses branches afin d'indirectement amplifier la réponse immunitaire antitumorale (**Tableau 3**). Ce type de traitement comprend l'injection de cytokines de type Th1, l'emploi d'anticorps monoclonaux bloquant l'angiogenèse et le blocage des systèmes « checkpoint » du système immunitaire.

Tableau 3. Stratégies d'immunothérapie non spécifique.

Stratégie*	Mécanismes d'action et avantages	Principaux désavantages	Références
Cytokine IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-12, GM-CSF	- Activation du système immunitaire cytotoxique (lymphocytes CTL, NK, NKT, T γ δ)	- Efficacité restreinte - Choc cytokinique en cas de surdosage	Lee et Margolin 2011 ; Farkona <i>et al.</i> 2016
Bloqueur d'angiogenèse Anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF ou VEGFR	- Bloque l'angiogenèse - Empêche le recrutement de cellules immunosuppressives (Treg, MDSC)	- Inhibe également le recrutement des cellules effectrices - Hypertension, hémorragie, thrombose	Adams et Weiner 2005 ; Weiner <i>et al.</i> 2010
Checkpoint inhibiteur Anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1, PD-L1, CTLA-4, Tim-3, LAG-3	- Réduit le seuil d'activation des lymphocytes T - Empêche l'immunotolérance des tumeurs et libère la réponse antitumorale pré-existante	- Résistance de certaines tumeurs - Effets secondaires de type auto-immuns - Effet visible uniquement plusieurs mois après l'injection	Pardoll 2012 ; Durgeau <i>et al.</i> 2018

* Les stratégies écrites en gras sont les approches déjà autorisées par la FDA.

1.2.2. Immunothérapie passive spécifique

L'immunothérapie passive cherche à mimer le système immunitaire en remplaçant ou modifiant *ex vivo* des composants immunitaires. Ceux-ci sont prélevés chez des patients portant une tumeur, modifiés ou activés *ex vivo* avant d'être réadministrés au même patient pour lui apporter une immunité efficace et spécifique de remplacement, dirigée contre les cellules tumorales (**Tableau 4**). Ce type de traitement comprend l'injection

d'anticorps monoclonaux ciblant des TAA, qui vont se lier aux cellules tumorales et permettre leur destruction ciblée par des effecteurs du système immunitaire. Des cellules immunitaires entières peuvent aussi être utilisées, celles-ci sont prélevées chez le patient et activées *ex vivo* afin d'être plus aptes à combattre la tumeur, puis elles sont réinjectées au donneur. Cette méthode est appelée transfert adoptif où des CTL peuvent par exemple être stimulés *ex vivo* en présence de protéines tumorales puis amplifiés avant d'être réadministrés.

Tableau 4. Stratégies d'immunothérapie passive.

Stratégie*	Mécanismes d'action et avantages	Principaux désavantages	Références
<p>Anticorps monoclonaux</p> <p>Cibles : HER2, CD20, CD52, EGFR, G250, Ep-CAM, TRAIL-R</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Principal mécanisme : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) : effet spécifique et direct 	<ul style="list-style-type: none"> - Hypersensibilité, allergie - Toxicité lorsque le TAA n'est pas spécifique de la tumeur 	<p>Adams et Weiner 2005 ; Weiner <i>et al.</i> 2010</p>
<p>Transfert adoptif de CTL</p> <p>Restreint aux mélanomes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Isolation de CTL à partir de biopsie tumorale - Amplification et enrichissement en CTL spécifiques <i>ex vivo</i> puis ré-infusion - Surmonte l'immunosévérité 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode coûteuse et complexe pour une utilisation en clinique - Risque de contamination - Durée de vie des CTL très faible et absence de réponse mémoire 	<p>Rosenberg et Restifo 2015 ; Durgeau <i>et al.</i> 2018</p>
<p>Lymphocytes T-modifiés (TCR)</p> <p>Peptides cibles : MART1, gp100, NY-ESO, p53, MAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Modification <i>ex vivo</i> de CTL pour permettre l'expression d'un TCR invariant reconnaissant un peptide de la tumeur 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode coûteuse et complexe pour une utilisation en clinique - Risque de contamination - (Uniquement TCR) Dépendant de l'expression du CMH-I par la tumeur 	<p>Bonini et Mondino 2015 ; Rosenberg et Restifo 2015</p>
<p>Lymphocytes T-modifiés (CAR-T)</p> <p>Cibles : CD19, EGFR, BCMA, PSMA, HER2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Modification <i>ex vivo</i> de CTL pour permettre l'expression d'un CAR spécifique d'un TAA membranaire - Indépendant de l'expression du CMH-I 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité lorsque le TAA est exprimé dans d'autres tissus - Risque lié à la manipulation génétique 	<p>Bonifant <i>et al.</i> 2016; Bonini & Mondino 2015; Wilkins <i>et al.</i> 2017</p>

* Les stratégies écrites en gras sont les approches déjà autorisées par la FDA

Il est également possible de modifier génétiquement les lymphocytes T des patients pour induire l'expression d'un TCR invariant reconnaissant un complexe peptide-CMH exprimé par la tumeur. Récemment, il a également été proposé de modifier les lymphocytes T afin qu'ils expriment un CAR, *chimeric antigen receptor*, produit de la fusion du domaine Fv d'un anticorps dirigé contre un TAA et des domaines de signalisation d'un TCR (Jackson et al. 2016; Hartmann et al. 2017) (**Figure 8**). Ce récepteur chimérique exprimé par les CTL va se lier directement au TAA à la surface des cellules tumorales grâce à la partie Fv, ce qui va induire une activation classique de ce lymphocyte, grâce aux domaines de signalisation du TCR

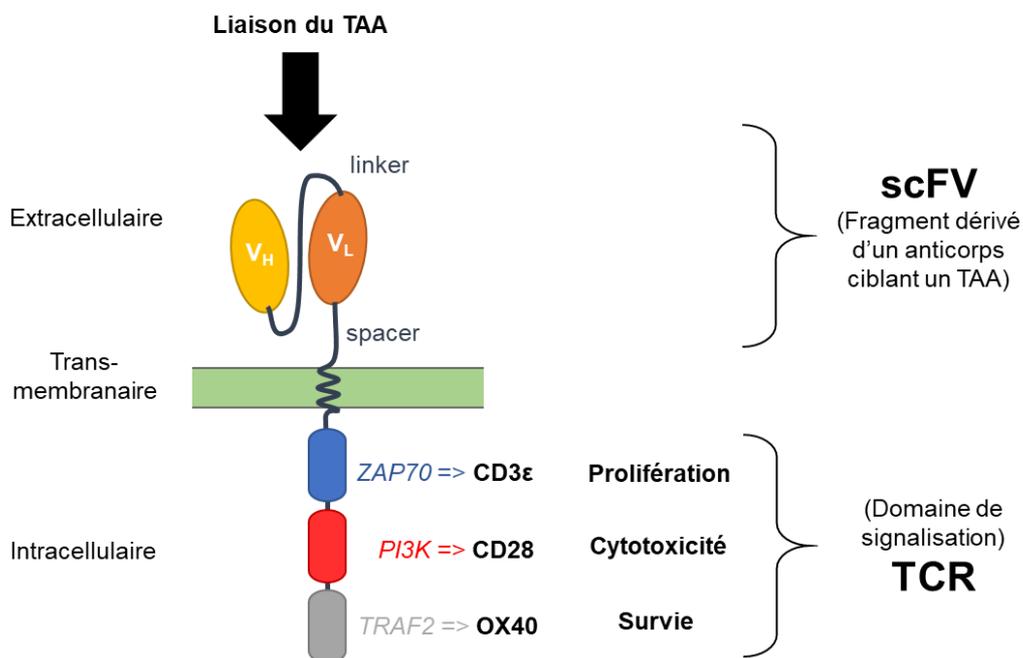


Figure 8. Structure d'un CAR, *chimeric antigen receptor*.

Le récepteur chimérique est composé d'une partie extracellulaire formée du domaine liant les TAA (scFv) et d'une partie intracellulaire composée de plusieurs domaines de signalisation du TCR, liées par un domaine transmembranaire. Le domaine *ZAP70* (bleu) confère la fonction effectrice aux cellules CAR-T, la kinase *PI3K* (rouge) est un domaine de costimulation impliqué dans la prolifération cellulaire et la sécrétion de cytokines et le domaine *TRAF2* (gris) promeut la survie des cellules T.

1.2.3. Immunothérapie active spécifique

Pour finir, l'immunothérapie active (ou approche vaccinale) consiste à stimuler directement *in vivo* le système immunitaire adaptatif du patient afin qu'il reconnaisse et détruise spécifiquement le cancer (**Tableau 5**). Pour cela, des cellules cancéreuses

entières, des lysats tumoraux ou des TAA purifiés (formulés dans un vaccin) sont injectés au patient afin de monter une réponse immunitaire efficace contre la tumeur. Il est également possible de réaliser un transfert adoptif de cellules dendritiques prélevées chez le patient, qui seront activées et chargées en TAA *ex vivo* avant d'être réinjectées.

Tableau 5. Stratégies d'immunothérapie active.

Stratégie*	Mécanismes d'action et avantages	Principaux désavantages	Références
<p>Transfert adoptif de cellule dendritique</p> <p>Cibles : PAP, PSA, MAGE, MART1 (*)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Isolation des DC à partir du sang des patients, chargement en antigènes (lysats tumoral, peptide, ARN) et activation (IL-2, GM-CSF) - Réponse durable 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité clinique modeste - Coûteux, production et administration complexes - Risque de contamination - Efficacité clinique uniquement plusieurs mois après l'injection 	<p>Farkona et al. 2016; Palucka & Banchereau 2012</p>
<p>Vaccin</p> <p>Cibles : MART-1, gp100, tyrosinase, NY-ESO-1, MAGE, HER2, MUC1</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Injection d'éléments tumoraux (cellules, protéines, peptides) - Prix abordable, production et administration facile - Spécifique, sûr, moins d'effets secondaires - Réponse durable 	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité limitée en monothérapie - Difficulté à surmonter l'immunotolérance 	<p>Dillman 2016; Wong et al. 2016</p>

* Les stratégies écrites en gras sont les approches déjà approuvées par la FDA.

1.3. Combiner l'immunothérapie avec d'autres traitements

Pendant longtemps, l'effet délétère des traitements classiques contre le cancer (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) sur le système immunitaire a été pointé du doigt comme une preuve que celui-ci n'était pas nécessaire à l'efficacité d'une thérapie antitumorale. Cependant, de plus en plus de preuves s'accumulent et démontrent que ces traitements conventionnels sont en réalité capables, sous certaines conditions, d'activer le système immunitaire (Butterfield 2015). En effet, la destruction des cellules tumorales agit comme un vaccin thérapeutique, en permettant la libération d'un grand nombre d'antigènes tumoraux et provoquent une inflammation localisée favorisant le recrutement de cellules immunitaires et l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale (Zitvogel et al. 2008; Lesterhuis et al. 2011; Emens & Middleton 2015) (**Figure 9**).

La chirurgie, en retirant la majorité des cellules tumorales, permet aussi d'ôter son environnement immunosuppresseur (cellules immunitaires régulatrices ou facteurs dérivés de la tumeur) et conduit à un relargage de TAA et de DAMP par les cellules mortes. Il a été montré que l'ablation de la tumeur par radiofréquence ou chaleur permet le développement d'un plus grand nombre de lymphocytes CTL mémoires spécifiques de la tumeur, associé à un plus faible taux de récurrences par rapport à une résection classique (Xia et al. 2012; Mizukoshi et al. 2013). L'immunothérapie peut donc être utilisée après l'ablation de la tumeur pour renforcer le système immunitaire activé. Il a néanmoins été décrit qu'il était parfois préférable que la tumeur soit toujours présente pour permettre une meilleure efficacité de l'immunothérapie (Liu et al. 2016).

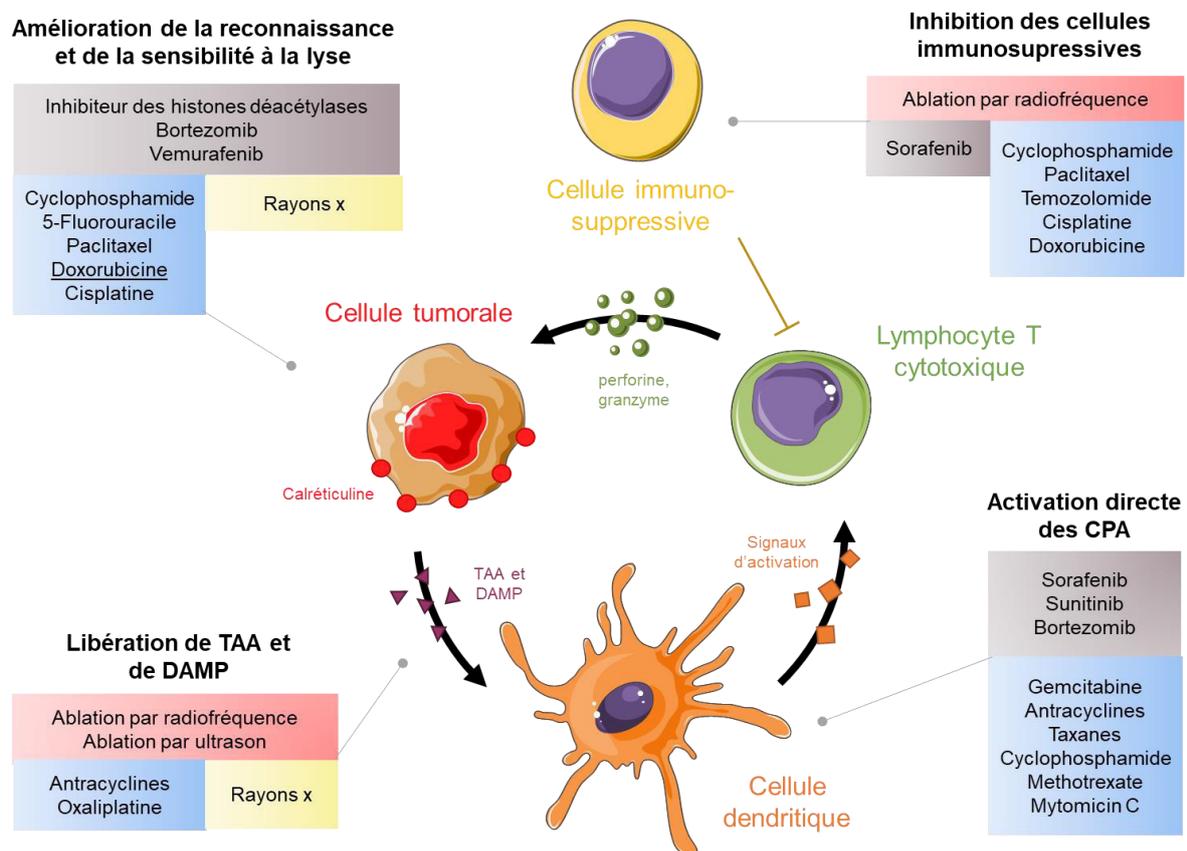


Figure 9. Autres traitements impactant positivement la réponse immunitaire antitumorale.

La chirurgie (rouge), la radiothérapie (jaune), la chimiothérapie (bleu) et les petites molécules inhibitrices (gris) peuvent avoir un impact sur la réponse immunitaire en : 1) « stressant » les cellules tumorales pour qu'elles soient plus immunogènes et sensibles à la lyse, 2) induisant une mort immunogène responsable de la libération de TAA et DAMP, 3) activant directement les DC et 4) inhibant les cellules immunosuppressives.

Les agents chimiothérapeutiques peuvent induire différents types de mort dont la « mort immunogène » qui permet la surexpression de la calréticuline à la surface des cellules tumorales (reconnu comme un signal « *eat me* »), le relargage de nombreux DAMP (ATP, HMGB1 et Hsp90) et la libération de TAA (Garg et al. 2017). Certaines molécules sont capables d'activer directement les DC et de permettre une meilleure cross-présentation. Il a également été montré que de faibles doses de chimiothérapie inhibaient principalement les cellules immunosuppressives (Treg et MDSC) libérant ainsi les CTL précédemment inhibés (Alizadeh & Larmonier 2014). Certains agents intercalants ou inhibiteurs d'histone désacétylase sont également responsables de dommages à l'ADN qui conduit à une surexpression par les cellules tumorales de CMH-I, de ligand NKG2D ou de récepteurs de mort, les rendant ainsi plus sensibles à la lyse par les cellules cytotoxiques (Zitvogel et al. 2008).

La radiothérapie cause des dommages à l'ADN, létaux pour les cellules tumorales et induit le relargage de TAA. L'application de rayons X sur une tumeur peut provoquer la diminution d'une lésion tumorale éloignée de la zone d'irradiation. Ce mécanisme avait été appelé effet abscopal et il a été prouvé depuis que cet effet est médié par le système immunitaire activé par la radiothérapie (Ngwa et al. 2018).

Une autre innovation récente en oncologie concerne le développement de petites molécules inhibitrices conçues pour court-circuiter les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie des cellules tumorales. Par exemple, l'inhibiteur de BRAF (dabrafenib) a pour effet d'augmenter l'expression de TAA (MART, TYRP-1, et GP100) et de réduire les marqueurs de surface immunosuppresseurs produits chez des patients atteints de mélanomes. Ces effets secondaires sont associés à une plus forte infiltration de CTL permettant à certains patients atteints de mélanome de revenir à un état d'équilibre de croissance tumorale (Frederick et al. 2013).

Bien que pouvant être employée en monothérapie, l'avenir de l'immunothérapie repose clairement sur son utilisation en combinaison avec une deuxième immunothérapie ou avec d'autres types de traitements conventionnels contre le cancer (Lesterhuis et al. 2011).

1.4. Avantages et inconvénients de l'immunothérapie

Ainsi l'immunothérapie possède plusieurs approches différentes et complémentaires, ayant chacune divers avantages et inconvénients listés ci-dessus. Contrairement aux traitements classiques (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie), cette stratégie n'emploie pas de produits toxiques mais utilise un intermédiaire naturel pour lutter contre les tumeurs : notre propre système immunitaire. Outre les effets secondaires supposés réduits de cette thérapie, son intérêt principal repose sur la mémoire immunitaire stimulée par les traitements, qui sera capable de protéger les patients d'une éventuelle rechute ou de l'apparition de tumeurs métastatiques.

L'inconvénient majeur de l'immunothérapie est l'idée bien ancrée que la stimulation du système immunitaire peut également lever la tolérance au soi, et donc induire des phénomènes nocifs tels que des maladies auto-immunes. Dans le cas des mélanomes, il a effectivement été montré que des vaccins contenant des antigènes de différenciation (gp100 ou MART1) induisaient la lyse des mélanocytes sains ayant pour conséquence l'apparition d'un vitiligo (dépigmentation) sur la peau des patients (Dudley et al. 2002). Néanmoins, très peu de cas d'auto-immunités sévères ont été reportés à ce jour chez des patients traités par immunothérapie, ce phénomène étant plus largement observé dans les modèles murins (Finn 2017). De plus, les symptômes de type auto-immuns ou inflammatoires (colite, diarrhée, hépatite, néphrite, éruption cutanée, vitiligo) ont été corrélés avec une meilleure réponse clinique et survie des patients traités par de l'ipilimumab, faisant de ces effets secondaires une toxicité acceptable et un marqueur facilement détectable de l'efficacité du traitement (Weber 2009).

Une autre crainte associée à l'emploi d'agents immunothérapeutiques est que la « pression » immunitaire générée par le traitement augmente le risque d'apparition de cellules tumorales résistantes à l'immunothérapie, comme cela est également observé pour la chimiothérapie. Dans le cas du ciblage des récepteurs inhibiteurs « checkpoint », approximativement 1 patient traité sur 4 est susceptible de faire une récurrence, même en recevant le traitement en continu (Sharma et al. 2017). Une solution à cette résistance acquise par les tumeurs serait de combiner plusieurs types d'immunothérapies (eg. administration conjointe d'@PD-1 et @CTLA-4) ou de cibler plusieurs TAA pour surmonter la résistance tumorale et augmenter l'efficacité clinique de ces traitements (Schmidt 2017)

Le deuxième inconvénient majeur de l'immunothérapie est leur faible efficacité contre des tumeurs solides, une étude ayant reportée un taux de réponses inférieur à 5 % sur

plus de 1000 patients traités (Rosenberg et al. 2004). En effet, le traitement par immunothérapie est bien souvent évalué chez des patients ayant une récurrence de leur cancer, qui ont préalablement subi plusieurs administrations de chimiothérapie et qui possèdent donc des tumeurs plus agressives et résistantes (Mocellin et al. 2004). Afin de conclure quant à l'efficacité d'une stratégie, il serait plus judicieux d'évaluer le traitement en tant qu'adjuvant (administration directement après ou conjointement à un autre traitement) ou néo-adjuvant (administration avant la chirurgie, Liu *et al.* 2016) plutôt qu'en monothérapie lorsqu'il ne reste plus aucune autre option clinique.

En somme, l'immunothérapie ne peut constituer à elle seule une solution miracle pour les patients atteints de cancer, mais combinée avec les autres traitements dits « classiques », elle représente une nouvelle option thérapeutique plus sûre, spécifique et adaptable à chaque type de tumeur.

2. La vaccination thérapeutique

Les vaccins antitumoraux représentent une des stratégies immunothérapeutiques les plus spécifiques, les moins toxiques et les plus aptes à engendrer une mémoire immunitaire. L'objectif de cette stratégie est la délivrance de TAA dans le corps humain afin d'éduquer le système immunitaire à détruire les tumeurs. Les vaccins peuvent soit réactiver des lymphocytes T spécifiques pré-existants, soit induire la différenciation de nouveaux effecteurs. Dans cette partie, seuls les vaccins utilisés en thérapie seront commentés, bien qu'il soit également possible de les utiliser en prévention (vaccination prophylactique) pour des cancers liés à une infection virale ; comme le cancer du col de l'utérus induit par l'HPV16-17, prévenu par les vaccins Gardasil® et Cervarix® (Harper & DeMars 2017).

2.1. Différentes classes de vaccins thérapeutiques

Les vaccins contre le cancer peuvent être de différents types en fonction de la nature de l'antigène employé : cellules tumorales entières, acides nucléiques codant pour un TAA, protéines, peptides ou cellule dendritique chargée avec des antigènes (**Figure 10**). Cette dernière catégorie ne sera pas discutée, étant plus proche de l'immunothérapie de remplacement (passive).

2.1.1. Les vaccins à base de cellules tumorales entières ou de lysat

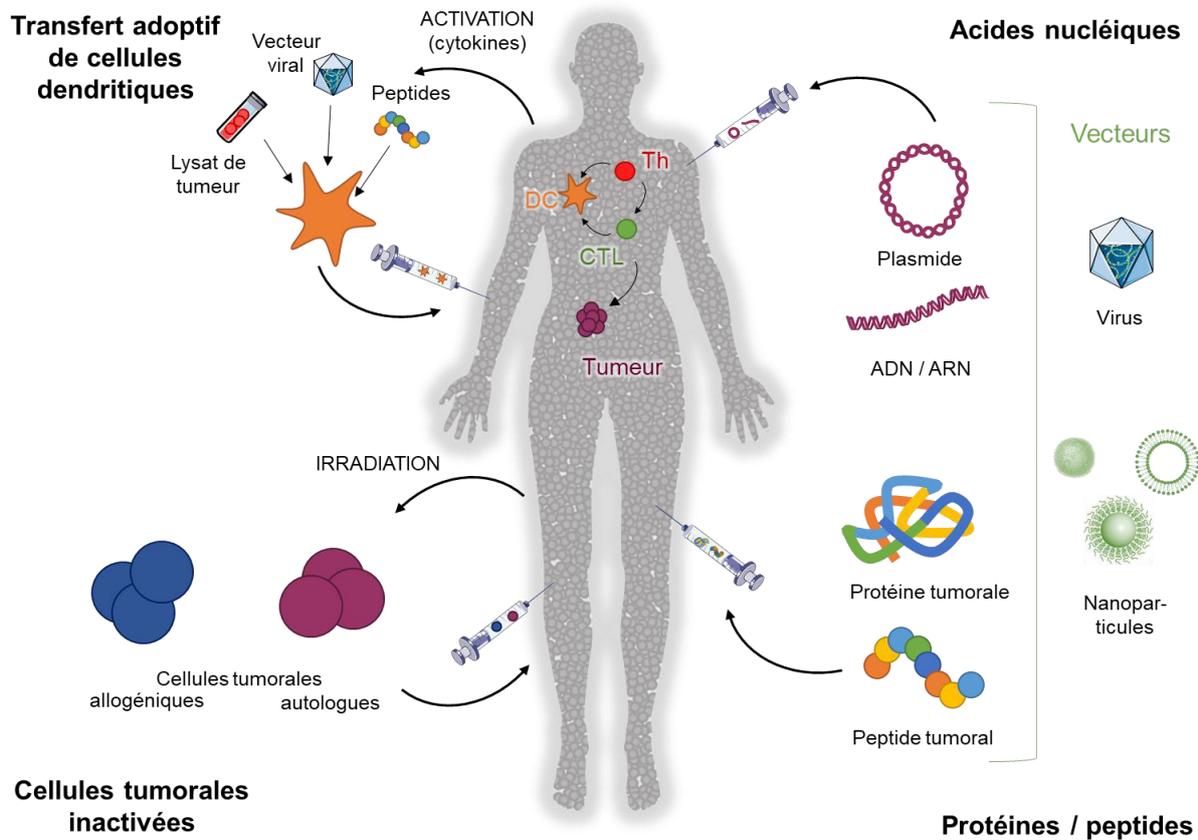


Figure 10. Stratégies vaccinales contre le cancer.

Il existe différentes approches permettant la délivrance de TAA afin d'éduquer le système immunitaire à détruire les tumeurs. Elles sont classées en 4 catégories : i) le transfert adoptif de DC activées et chargées *ex vivo*, ii) les cellules tumorales inactivées, iii) les acides nucléiques (ADN, ARN, plasmide) et iv) les protéines entières ou peptides dérivés des TAA. Les deux dernières catégories peuvent également être vectorisées par des nanoparticules ou des virus. D'après (Berzofsky et al. 2004; Butterfield 2015).

L'utilisation de cellules tumorales autologues (provenant du patient) est l'une des premières stratégies vaccinales utilisées pour traiter le cancer (Hanna & Peters 1978). Les cellules cancéreuses sont prélevées à partir de biopsie puis irradiées ou lysées et combinées avec des immunostimulants (appelés adjuvants). Elles sont ensuite réadministrées au patient à partir duquel elles avaient été isolées. Les cellules autologues peuvent être modifiées pour exprimer des cytokines (IL-12, GM-CSF,...) qui leur confèrent une plus grande immunogénicité (Dranoff et al. 1993; Asada et al. 2002). L'un des plus grands succès de ce type de vaccin est le GVAX développé par Somatix en 1993, qui consiste en l'administration de cellules tumorales autologues modifiées génétiquement

pour exprimer le GM-CSF. Ce vaccin a montré de bons résultats lors d'essais cliniques chez des patients atteints de cancer du poumon (CPNPC) et des résultats modestes contre des carcinomes rénaux ou des mélanomes (Nemunaitis 2005). L'emploi de cellules tumorales autologues (modifiées ou non) a comme avantage de présenter la totalité des TAA exprimés par la tumeur au système immunitaire (Guo et al. 2013). Cette stratégie est cependant restreinte aux cancers accessibles à une biopsie et permettant la culture de suffisamment de cellules pour la préparation d'un vaccin (Copier & Dalglish 2006).

Une alternative à cette stratégie est l'utilisation de cellules tumorales allogéniques (provenant d'un autre patient) établies en lignée cellulaire et pouvant être maintenues en culture. Hormis la difficulté à établir des cultures stables, cette technologie a comme limite majeure la nécessité de compatibilité entre le donneur et le patient, en terme d'expression du CMH. Les essais cliniques avec cette thérapie ont été décevants jusqu'à présent (Seledtsov et al. 2015).

2.1.2. *Les vaccins à base d'acides nucléiques*

Afin de délivrer des antigènes tumoraux *in vivo*, il est également possible d'utiliser des acides nucléiques codants pour une protéine tumorale. Suite à leur administration, ceux-ci vont passer la membrane plasmique et nucléaire des DC, qui va produire le TAA dans leur cytoplasme. Cette protéine sera ensuite dégradée en peptides tumoraux présentés par le CMH-I (Liu 2011).

Cette stratégie emploie majoritairement un plasmide bactérien, comprenant un promoteur qui fonctionne dans les cellules de mammifères et un gène codant pour le TAA. Les intérêts principaux de cette stratégie sont sa capacité intrinsèque à stimuler l'immunité innée grâce à l'ADN bactérien (Spies et al. 2003) et la capacité du plasmide à porter plusieurs gènes et donc à exprimer plusieurs antigènes (Suhriebier 1997). Sa production est également facile, peu onéreuse et ses conditions de manipulation ou de conservation ne nécessitent pas de précaution particulière. Bien que cette stratégie ait donné de très bons résultats au stade préclinique, le passage de la souris à l'humain a été un échec, en raison d'une faible efficacité des acides nucléiques trop rapidement dégradés ou à un mauvais ciblage des DC (Liu & Ulmer 2005). Depuis lors, de nouvelles méthodes d'administrations ont été développées telles que l'électroporation *in vivo* (Lambricht et al. 2016) ou l'emploi de vecteurs viraux non virulents (adénovirus, poxvirus, herpès virus), qui ont démontré leur capacité à augmenter l'immunogénicité des vaccins à ADN et le ciblage

des DC. L'intérêt des vecteurs viraux est leur capacité adjuvante intrinsèque, qui accélère leur prise en charge par le système immunitaire et leur internalisation par les CPA (Anderson & Schneider 2007). Cependant, un désavantage majeur de la vectorisation virale est l'impossibilité de réaliser une seconde injection du traitement car celui-ci sera neutralisé par les anticorps dirigés contre la capsid virale, produits lors de la première injection (Larocca & Schlom 2011). Il est également possible de vectoriser de l'ADN avec des nanoparticules comme cela sera détaillé pour les vaccins peptidiques dans le §C de l'introduction.

Des vaccins à ARN ont également été développés, selon l'idée qu'ils seraient plus sûrs (en raison de leur incapacité à s'intégrer au génome humain), leur rapide taux de dégradation les rendant moins susceptibles d'induire une auto-immunité (Guo et al. 2013). Cette stratégie emploie de l'ARNm autologue extrait des tumeurs ou de l'ARN synthétique stabilisé codant pour des TAA (Scheel et al. 2004; Carralot et al. 2005). Les vaccins à ARN ont uniquement été évalués lors d'essais cliniques de phase I/II contre des mélanomes (Lundstrom 2018).

2.1.3. *Les vaccins à base de peptides tumoraux*

L'objectif final de la vaccination thérapeutique est d'activer les lymphocytes T spécifiques de la tumeur par reconnaissance d'un épitope tumoral associé au CMH présenté à la surface des DC. La stratégie la plus commune consiste à administrer des épitopes peptidiques dérivés des TAA, formulés avec des adjuvants pour cibler activement ou passivement les DC.

2.1.3.1. *Développement et évaluation clinique*

Les vaccins à base de peptides tirent profit de la découverte de nombreux TAA (cf. §A.2.1.2, Introduction) et des outils bio-informatiques permettant l'identification d'épitopes tumoraux candidats pouvant s'associer au CMH. L'antigénicité de divers épitopes a ainsi pu être évaluée expérimentalement par comparaison de leur capacité à être présentés par la DC et à induire la différenciation de lymphocytes T effecteurs spécifiques des cellules tumorales. Cette stratégie a été employée dans de nombreux modèles murins et a permis l'identification de nombreux épitopes peptidiques capables d'induire un rejet de la tumeur (Guo et al. 2013).

Ces épitopes sont en cours d'évaluation chez l'Homme, où diverses formulations vaccinales (simples ou multi-épitopes, avec ou sans vecteurs, différents adjuvants) sont à l'essai. Certains vaccins peptidiques, dirigés contre différents types de cancer (sein, poumons, mélanome et pancréas) ont été évalués lors d'essais cliniques de phase III (Vacchelli et al. 2012a; Melero et al. 2014) (**Tableau 6**). Pour chacun des vaccins présents dans ce tableau, le traitement a permis la différenciation de lymphocytes T spécifiques et l'induction d'une réponse immunitaire spécifique détectable chez presque 100% des patients, atteignant parfois un taux de 1 à 5% de CTL circulants (Buonaguro et al. 2011). Parmi ces essais cliniques, très peu ont été arrêtés précocement pour manque d'efficacité mais seulement 3 ont finalement atteint leurs objectifs cliniques en terme de survie ou de récurrences.

L'observation de plusieurs cas cliniques, où la vaccination antitumorale a permis d'induire une réponse durable et efficace, suggère que cette stratégie présente tout de même un intérêt thérapeutique important. Pour améliorer l'immunogénicité des vaccins et permettre au système immunitaire de surmonter les mécanismes de résistance des cellules tumorales, il est nécessaire d'optimiser la formulation des vaccins contre le cancer et de trouver des approches combinatoires efficaces avec d'autres types de traitements.

2.1.3.2. Avantages des vaccins peptidiques

Comparée aux stratégies employant des cellules autologues, la vaccination peptidique a pour avantage d'utiliser des TAA synthétiques, clairement définis, peu onéreux et facile à produire. La production industrielle de ce type de vaccin est envisageable, les peptides sont stables et ne nécessitent pas des conditions de conservation et d'utilisation très contraignantes.

Leur sûreté et leur efficacité à induire une réponse immunitaire chez l'Homme ne sont plus à démontrer. Un autre avantage est la facilité pour mesurer l'efficacité des vaccins peptidiques, en contrôlant le taux de lymphocytes T spécifiques dans le sang des patients. En plus de leur capacité à induire une réponse immunitaire mémoire et une protection sur le long terme contre les récurrences, il est également possible d'injecter à plusieurs reprises un vaccin (boost) sans risque de toxicité.

Tableau 6. Les essais cliniques de vaccins peptidiques phase III).

Traitement	TAA	Adjuvant	Indications	n	Références
CANCER DU SEIN					
NeuVax™	HER2/neu	GM-CSF	Stade précoce à ganglion positif	758 [#]	Amin et al. 2008; Mittendorf et al. 2012
Theratope	Sialyl-Tn	KLH	Cancer du sein métastatique en rémission après un traitement de chimiothérapie	950	<i>En cours</i> Ibrahim et al. 2013
CANCER DU POUMON					
Stimuvax® (Tecemotide)	MUC1	Liposome-MPLA + cyclophosphamide	Cancer du poumon « non à petites cellules » (CPNPC), stade III inopérable	1513 [#]	Butts et al. 2014; DeGregorio et al. 2014; Mitchell et al. 2015
TG4010	MUC1	MVA-IL-2	CPNPC stade avancé + chimiothérapie	148 [#]	Quoix et al. 2011
GSK1572932A	MAGE-A3	Liposomal AS15	Après chirurgie d'un CPNPC (pour éviter récurrence/métastase)	2278 ^{\$}	Vansteenkiste et al. 2016
MELANOME					
MDX-1379	gp100	Montanide ISA-51	Mélanome épidermique inopérable de stade III ou IV, précédents traitements ont échoués	1783 [#]	Hodi et al. 2010; McDermott et al. 2013
Multi-épitope	Tyrosinase, gp100, MART-1	Montanide ISA-51 / IFA + GM-CSF	Après chirurgie d'un mélanome épidermique de stade IV (pour éviter récurrence)	815 [#]	Lawson et al. 2015
Multi-épitope	gp100, MART-1, NA17-A	/	Mélanome oculaire (pour éviter métastases au niveau du foie)	13	<i>En recrutement</i>
Seviprotimut-L (POL-103A)	Polyvalent, mélange de protéines	Alum	Après chirurgie d'un mélanome épidermique à haut risque de récurrence	1059	<i>En cours</i>
Monopeptide	gp100	Montanide ISA-51, IL-2	Mélanome stade avancé ou métastatique	185 [#]	Schwartzentruber et al. 2011
GSK2132231A	MAGE-A3	Liposomal AS15	Après chirurgie d'un mélanome épidermique (pour éviter récurrence)	1351 ^{\$}	Dreno et al. 2018
CANCER DU PANCREAS					
GV1001	Téломérase	GM-CSF	Cancer du pancréas stade avancé ou métastatique, seul ou en combinaison avec de la chimiothérapie	1110 [#]	Middleton et al. 2014
GLIOBLASTOME					
Rindopepimut	EGFRvIII	GM-CSF	Glioblastome stade précoce, après chimiothérapie	745 [#]	Weller et al. 2017
AUTRES CANCERS RARES					
CMB305	NY-ESO-1	LV305, pyranosyl lipid A	Sarcome de la synovie inopérable ou métastatique	248	<i>En recrutement</i>

Source : Clinicaltrials.gov website; dernier accès le 21 juin 2018. # étude complète ‡ étude arrêtée plus tôt à cause de la suspension clinique du traitement \$ étude arrêtée pour manque d'efficacité

MPLA : monophosphoryl lipid A, MVA : *modified vaccinia virus ankara*, IFA : *incomplete freund adjuvant*

2.1.3.3. Limites des vaccins peptidiques

A cause du caractère défini des épitopes, les vaccins à base de peptides sont généralement restreints à un seul haplotype du CMH qui n'est pas forcément exprimé par la totalité de la population. De plus, l'antigène ciblé par le vaccin peut ne pas être exprimé par tous les cancers du même type (hétérogénéité intertumorale), et une partie des cellules à l'intérieur d'une même tumeur peut également avoir perdu l'expression de ce TAA (hétérogénéité intratumorale). Ces deux restrictions sont cependant facilement contournées par l'utilisation de vaccins multi-épitopiques. Les vaccins contenant plusieurs épitopes permettent d'activer différents clones de lymphocytes T qui reconnaissent différents épitopes d'un même antigène ou plusieurs antigènes exprimés par la tumeur (Slingluff 2011; Walter et al. 2012; Hu et al. 2014). Il a été montré que la compétition de plusieurs épitopes, internalisés par les DC, pour le même haplotype du CMH ne perturbait pas l'induction de la réponse immunitaire antitumorale, et que l'efficacité du vaccin semblait être proportionnelle au nombre de peptides différents présents dans le vaccin (Thompson et al. 2004).

L'inconvénient majeur des peptides est leur faible immunogénicité, qui nécessite une administration conjointe avec un adjuvant immunostimulant (cf. §B.3.3, Introduction). Un autre obstacle à l'utilisation clinique des vaccins peptidiques contre le cancer est leur faible efficacité à franchir l'immunotolérance induite par les tumeurs. Pour cela, les vaccins doivent être capables de délivrer un grand nombre d'épitopes peptidiques aux DC et de les activer efficacement avec des adjuvants adaptés, capables d'orienter convenablement le système immunitaire vers une réponse de type cytotoxique (Farkona et al. 2016).

La limite de l'utilisation des peptides en vaccination est leur faible demi-vie dans les milieux physiologiques, où ils sont très rapidement dégradés par des peptidases. De plus, leur administration n'est souvent pas ciblée (injection sous-cutanée), conduisant à leur internalisation par les cellules épithéliales ou par des cellules phagocytaires autres que les DC (macrophages et monocytes). Les peptides seront donc détruits ou présentés sans co-stimulation aux lymphocytes T conduisant à leur anergie ou tolérance pour le TAA ciblé. L'efficacité des vaccins peptidiques pourrait donc être limitée par ces deux phénomènes, ce qui expliquerait en partie les résultats cliniques décevants ayant été observés ces dernières années (Slingluff 2011). Une solution à ces limitations est l'utilisation de vecteurs viraux ou nanoparticulaires, qui offrent une protection aux peptides, jouent un rôle adjuvant et peuvent cibler les DC s'ils sont associés aux ligands adéquats (cf. §C, Introduction).

3. Les trois éléments vaccinaux essentiels

Différentes approches vaccinales ont déjà été évaluées, utilisant des peptides seuls ou multiples, longs ou courts, et des protéines entières (Slingluff 2011). Toutes ces stratégies se rejoignent cependant sur l'importance capitale de trois éléments clefs : i) l'induction d'un grand nombre de CTL spécifiques de la tumeur, ii) la présence de Th1 différenciés et iii) la stimulation de DC matures capables de réaliser la cross-présentation. Un vaccin efficace devra donc être capable d'activer ces trois types cellulaires en contenant : un épitope peptidique CD8, un épitope peptidique CD4 et un adjuvant.

3.1. Le peptide CD8

L'objectif principal d'un vaccin contre le cancer est la différenciation de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques capables de reconnaître des épitopes tumoraux exprimés à la surface des cellules cancéreuses et d'induire leur apoptose. Une difficulté majeure dans le développement d'un vaccin est donc le choix d'un antigène adéquat, spécifique de la tumeur. Idéalement, les vaccins devraient cibler des antigènes non exprimés par les cellules normales, cependant la majorité des TAA découverts sont des protéines du soi dont l'expression a été modifiée dans les cellules tumorales.

A ce jour, la plupart des stratégies vaccinales se sont donc concentrées sur l'utilisation d'épitopes non spécifiques (exprimés par la tumeur et d'autres tissus), provenant de TAA de différenciation ou surexprimés par la tumeur (cf. §A.2.1.2, Introduction) (Finn 2017). Ces TAA ont pour avantage d'être souvent exprimés chez les patients et partagés par plusieurs types de cancers ; ils peuvent donc être utilisés pour traiter un plus grand nombre de patients (Gilboa 1999). Des épitopes restreints au CMH-I, provenant de ce type d'antigène (MAGE-A3, MART-1, MUC1, gp100, HER2/neu), ont été identifiés et évalués dans différents modèles murins, qui ont démontré avec succès leur potentiel thérapeutique (Novellino et al. 2005). Cependant, ces épitopes présentent en général une faible efficacité clinique, le risque d'effets secondaires de type auto-immuns et leur tendance à être tolérogènes étant des facteurs limitants à la poursuite des essais cliniques.

Au contraire les TAA viraux, exprimés par les cancers induits par une infection virale, ne possèdent pas ces limitations. Ces cancers représenteraient plus de 15% des cancers mondiaux, les principaux pathogènes responsables étant *Helicobacter pylori*, les virus de

l'hépatite B et C et le papillomavirus humain (de Martel et al. 2012). Différents vaccins portant des antigènes viraux ont déjà été développés et ont montré une efficacité très importante en prophylaxie (Melief et al. 2015). Leur utilisation en thérapeutique doit cependant faire face aux mêmes mécanismes immunosuppresseurs et de résistance tumorale que les autres types de cancer, ayant pour conséquence une diminution d'efficacité notable lors d'essais cliniques contre des cancers de stades avancés (Kenter et al. 2009; Poelgeest et al. 2016).

Pour les tumeurs n'exprimant pas d'antigène viral, le ciblage des néo-antigènes représente une solution alternative permettant le développement de vaccins personnalisés, réellement spécifiques de la tumeur. Ce type de TAA est le produit unique des mutations somatiques ayant lieu à l'intérieur d'une cellule tumorale et n'est donc pas exprimé par les autres cellules tumorales ou les tissus normaux. N'étant pas impactés par l'immunotolérance, les néo-antigènes sont des cibles idéales, qui induisent une réponse antitumorale non restreinte. La libération de néo-antigènes suite à la destruction des cellules tumorales aura pour conséquence d'amplifier et de diversifier la réponse immunitaire suivant un processus appelé « epitope spreading ». Jusque très récemment, l'impossibilité d'identifier en temps réel des néo-antigènes spécifiques à une tumeur était encore un obstacle technologique majeur freinant la conception de vaccins personnalisés. Néanmoins, l'avancée des méthodes de séquençage, des algorithmes de prédiction d'épitopes et la meilleure compréhension du mutanome ont permis le développement de procédés à l'origine des premiers vrais vaccins personnalisés contenant des antigènes uniques à chaque tumeur et à chaque patient (**Figure 11**).

Grâce à ces nouvelles méthodes, il a été démontré dans une étude comparative de plus de 1000 biopsies tumorales que les cancers présentant le plus grand taux de néo-antigènes étaient corrélés à une meilleure survie des patients et à un plus grand nombre de LIT (Brown et al. 2014; Giannakis et al. 2016). La forte immunogénicité de ce type de TAA a été prouvée dans plusieurs études (Schumacher & Schreiber 2015; Yarchoan et al. 2017). La faisabilité et la sûreté de thérapies vaccinales personnalisées ont déjà été démontrées lors de trois essais cliniques de phase I (Hu et al. 2018). En ce moment, cinq vaccins peptidiques personnalisés, trois vaccins à base d'acides nucléiques et un transfert adoptif de DC sont en cours d'évaluation lors d'essais cliniques chez l'Homme.

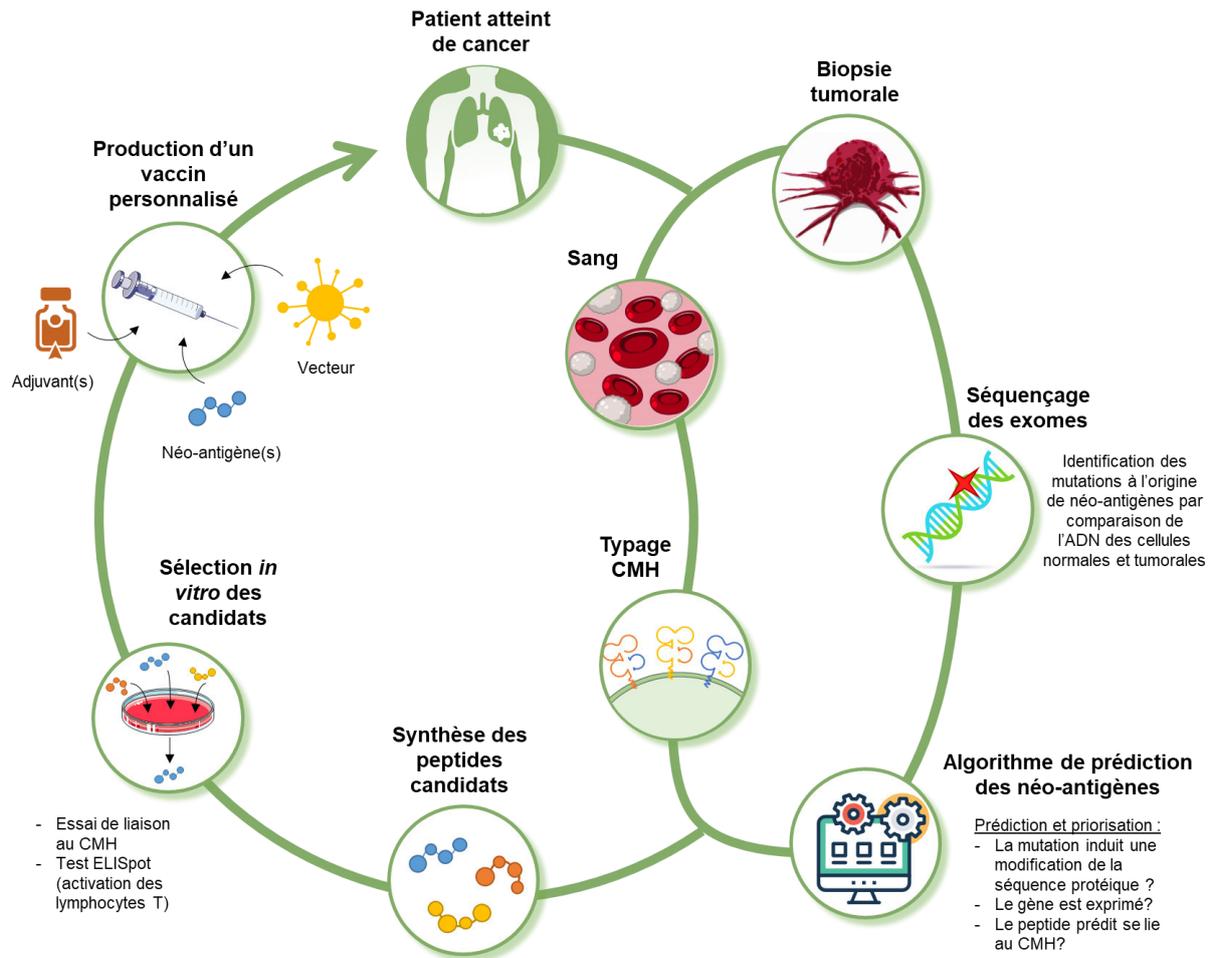


Figure 11. Développement d'un vaccin peptidique personnalisé.

Le sang des patients est prélevé afin de faire un typage HLA des lymphocytes circulants. L'ADN des cellules tumorales est extrait à partir d'une biopsie, séquencé et comparé à l'ADN des cellules saines pour identifier les mutations somatiques uniques. Un algorithme de prédiction est ensuite utilisé afin de confirmer le potentiel antigénique des néo-antigènes prédits par les mutations et déterminer leur affinité pour le CMH. Les épitopes candidats sont ensuite synthétisés et sélectionnés *in vitro* avant d'être incorporés dans un vaccin personnalisé en combinaison avec un adjuvant et un vecteur (optionnel). D'après (Aldous and Dong 2018; Hu et al. 2018).

3.2. Le peptide CD4

La capacité d'un vaccin à induire une activation durable et optimale des CTL est dépendante de la présence de lymphocytes T helper CD4⁺ de type Th1. En effet, ces cellules sont indispensables à la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL, et permettent également d'augmenter la viabilité des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Kennedy & Celis 2008; Kim & Cantor 2014). De plus, il a été montré que les lymphocytes

T CD4⁺ pouvaient avoir une activité cytotoxique et induire directement la destruction des cellules cancéreuses (Quezada et al. 2010). Leur rôle primordial dans la réponse immunitaire adaptative fait de ces cellules une cible secondaire à ne pas oublier lors du développement d'un vaccin antitumoral.

Différentes études ont effectivement mis en évidence une meilleure efficacité antitumorale des vaccins contenant un épitope CD4 porté par un peptide court (Ossendorp et al. 1998; Phan et al. 2003) ou contenu dans la même séquence peptidique que l'épitope CD8 (Fayolle et al. 1991; Knutson et al. 2001; Zeng et al. 2002). Une des méthodes permettant la combinaison des épitopes CD8 et CD4 dans un même vaccin est l'utilisation de peptides suffisamment longs (25-45 acides aminés) pour inclure de multiples épitopes, capables de se lier au CMH-I et CMH-II, qui se chevauchent dans la séquence peptidique (Zwaveling et al. 2002; Walter et al. 2012; van Poelgeest et al. 2013). Cette stratégie a été employée par différentes équipes qui ont toutes conclu à la supériorité des peptides longs par rapport aux peptides courts (Toes et al. 1996; Rosalia et al. 2013). En effet, les peptides longs présentent une conformation tertiaire les protégeant davantage des peptidases et leur longueur les empêche d'être présentés directement par les DC, qui doivent donc les internaliser et entreprendre un processus de cross-présentation (Slingluff 2011). Alors que les peptides courts sont suspectés d'induire une tolérance ou une anergie des lymphocytes effecteurs car ils seraient internalisés par des CPA non professionnelles. Une autre stratégie efficace permettant de délivrer simultanément des peptides courts, restreints au CMH-I et au CMH-II est l'utilisation de vecteurs nanoparticulaires (cf. §B.3.3.1.2, Introduction).

Il a également été proposé de traiter les patients uniquement avec des épitope CD4, selon l'idée que les Th1 activés par le vaccin aideraient à lever l'immunotolérance et stimuleraient les CTL pré-activés par la tumeur. Ce type de vaccin a effectivement montré un certain potentiel à induire la différenciation de lymphocytes Th et CTL spécifiques des tumeurs, associé à une réponse antitumorale de type Th1 dans des modèles murins (Khong et al. 2004; Wong et al. 2004). Des essais cliniques de phase avancée ont finalement montré que les vaccins se focalisant uniquement sur l'activation des Th n'étaient pas suffisamment efficaces pour obtenir une réponse antitumorale puissante et durable chez l'Homme (Knutson & Disis 2005; Slingluff et al. 2011).

Dans les articles précédemment cités, l'épitope CD4 choisi par les auteurs était dans tous les cas un peptide exprimé par la tumeur. Cependant, il est également possible d'utiliser un peptide CD4 non tumoral (appelé peptide hétérologue). Cette stratégie dérive de celle employée depuis de nombreuses années dans les vaccins préventifs utilisés contre les pathogènes (Löwenadler et al. 1990; Oscherwitz et al. 2009; Wen et al. 2016), où des protéines porteuses contenant des épitopes CD4 sont conjuguées avec des épitopes B pour permettre la production d'anticorps. Le peptide hétérologue le plus communément utilisé dans les vaccins contre le cancer est le «pan-DR binding synthetic helper » (PADRE, Alexander et al. 1994; del Guercio et al. 1997). Ce peptide est capable de se lier à tous les types d'HLA-DR et a été formulé dans différents vaccins multi-peptidiques dirigés contre des leucémies (Kuball et al. 2011), cancer du poumon (Barve et al. 2008). Il est actuellement en cours d'évaluation dans plus de 10 essais cliniques. Des peptides hétérologues issus de la toxine tétanique (Demotz et al. 1989; Valmori et al. 1992) ou la protéine porteuse keyhole limpet hemocyanin (KLH ; Harris & Markl 1999) ont également déjà été évalués.

La technologie permettant l'identification et l'évaluation d'épitopes CD4 spécifiques de la tumeur n'est encore qu'à ces débuts (Massilamany et al. 2015). L'utilisation de ce type de peptide universel, pouvant se lier à plusieurs haplotypes du CMH-II, reste tout de même une des alternatives les plus intéressantes pour l'activation des Th1.

3.3. Adjuvants

Les antigènes endocytés et apprêtés par des DC immatures, qui n'ont pas été activées par des signaux pathogènes ou inflammatoires, induisent une tolérance plutôt qu'une réponse immunitaire (Mellman & Steinman 2001). La faible immunogénicité des peptides rend donc nécessaire leur association avec des adjuvants, qui permettent un meilleur ciblage et une activation des DC. Le développement d'adjuvants vaccinaux puissants capables d'induire une réponse immunitaire adéquate est donc un enjeu principal pour le développement de vaccins peptidiques contre le cancer.

Il existe de nombreux types d'adjuvants qui ont été classés récemment en deux catégories d'après leur mode d'action principal : les systèmes de délivrance et les immunostimulants (Banday et al. 2015). Cette classification n'est cependant pas exclusive, certains systèmes de délivrance tels que l'alum et les virus possèdent également des propriétés intrinsèques immunostimulantes (cf. ci-dessous).

3.3.1. *Systèmes de délivrance*

Si l'adjuvant fonctionne en favorisant la rencontre des antigènes avec la DC immature et en permettant une meilleure internalisation des peptides, il sera classé dans la catégorie des systèmes de délivrance.

3.3.1.1. *Effet dépôt et émulsion*

Les adjuvants classiques tels que l'alum ou les émulsions eau-dans-l'huile agissent en créant un effet dépôt, qui permet la concentration des antigènes au point d'administration et leur libération progressive. L'alum est un adjuvant particulière utilisé depuis plus de 80 ans en vaccination. Il forme des agrégats avec les antigènes adsorbés à sa surface, permettant une meilleure internalisation par les DC et est également à l'origine d'une inflammation localisée qui induit le recrutement rapide des cellules de l'immunité innée et des DC sur le site d'injection (Clements & Griffiths 2002). Il a depuis été montré que l'alum pouvait également stimuler directement les DC en activant l'inflammasome Nrlp3 après avoir été phagocyté (Eisenbarth et al. 2008).

Les émulsions eau-dans-l'huile sont également approuvées pour leur utilisation en vaccination depuis plus de 50 ans, comme par exemple l'adjuvant incomplet de Freund (IFA, nom commercial Montanide®). Cet adjuvant, composé d'huile minérale ou de squalène, agit principalement en induisant un effet de dépôt et a déjà été très largement utilisé en oncologie ainsi que pour d'autres applications vaccinales (Aucouturier et al. 2006; Foged et al. 2015). Contrairement à l'alum qui induit une faible réponse de type Th2, l'IFA est capable d'augmenter les deux types de réponses cellulaire (Th1) et humorale (Aucouturier et al. 2002). Il existe également des émulsions huile-dans-l'eau (MF59, AS03) approuvées uniquement en Europe, qui sont utilisées principalement pour les vaccins saisonniers contre le virus de la grippe et certains vaccins préventifs en cours de développement contre HPV, VIH, HBV (Banday et al. 2015). Ce type d'adjuvant n'induit pas d'effet dépôt mais active directement les macrophages et les neutrophiles, ce qui résulte en une augmentation de la production locale de cytokines et chimiokines.

3.3.1.2. *Vecteurs*

Les épitopes CD8 et CD4 peuvent également être conjugués ou encapsulés dans des vecteurs nanoparticulaires (virus ou nanoparticules) qui vont agir comme systèmes de délivrance passifs ou actifs. Les vecteurs ont plusieurs rôles : i) protection des

antigènes contre la dégradation par des peptidases, ii) augmentation de l'internalisation des peptides courts en les intégrant à des structures d'une taille similaire à certains pathogènes et iii) passage dans la lymphe pour activer les DC résidentes des ganglions lymphatiques et induire plus rapidement l'activation des lymphocytes T (Khong & Overwijk 2016a).

Les virus atténués sont utilisés en général pour la transduction de vaccins à base d'ADN ou d'ARN codants pour les TAA. Dans le cas des vaccins peptidiques, les vecteurs viraux majoritairement utilisés sont les « particules de type viral » (VLP) et les virosomes (Krishnamachari et al. 2011).

Les VLP sont formées de capsides virales qui ne contiennent plus de matériel génétique ni de nucléocapside et sont donc incapables de se répliquer ou de retrouver un potentiel infectieux. Ces vecteurs peuvent être produits très facilement dans des systèmes de production biologique (levure, plante) et ont une immunogénicité intrinsèque leur permettant d'être activement internalisés par les DC (Ludwig & Wagner 2007). Ils sont principalement utilisés pour les vaccins préventifs de cancer viraux, afin d'immuniser les patients contre des peptides de la capside. Un vaccin quadrivalent formé des protéines L1 de la capside d'HPV6, 11, 16 et 18 (Gardasil®) est déjà commercialisé pour la prévention du cancer du col de l'utérus.

Les virosomes sont composés d'une bicouche lipidique comprenant des glycoprotéines virales ; ils portent encore les propriétés fusogéniques et antigéniques des virus mais ne contiennent plus de génome viral (Adamina et al. 2006). Des virosomes reconstitués à partir du virus de la grippe sont déjà utilisés dans des vaccins préventifs contre l'hépatite A (Epaxal®) et le virus Influenza (Inflexal®) et sont en cours d'évaluation en tant que vecteurs dans des vaccins peptidiques dirigés contre le cancer du sein, du col de l'utérus ou des mélanomes (Cusi 2006).

L'utilisation de nanoparticules, et notamment de liposomes, comme vecteur vaccinal, sera développée dans la prochaine partie (cf. §C, Introduction).

3.3.2. *Immunostimulants (agonistes des PRR)*

Tout comme il est possible d'utiliser un élément minimal et synthétique comme antigène (épitope peptidique), il a également été proposé d'utiliser des adjuvants moléculairement définis mimant la présence de pathogènes et capables d'induire la maturation des DC en tant qu'adjuvant (signal de danger). En effet, la découverte des premiers récepteurs reconnaissant des motifs pathogènes (PRR), les Toll chez la

drosophile et les TLR chez les mammifères, par Jules Hoffmann, Bruce Beutler et Ralph Steinman (Prix Nobel de Médecine de 2011), a pavé la voie vers l'activation de récepteurs spécifiques à l'immunité innée en vaccination (O'Neill et al. 2013). Dès l'or, d'autres PRR ont été découverts et de nombreux agonistes ont été développés afin d'être employés comme adjuvant immunostimulant dans les vaccins contre le cancer (Khong & Overwijk 2016a; Temizoz et al. 2016)

3.3.2.1. Les récepteurs PRR des cellules dendritiques

Les PRR (pattern-recognition receptors) sont des récepteurs reconnaissant des signaux de danger cellulaires (DAMP) ou microbiens (MAMP) ; leur activation a pour conséquence la maturation des cellules dendritiques. Ils peuvent être membranaires comme les TLR (« Toll-like receptors ») et les CLR (« C-type Lectin receptors ») (**Figure 12**) ou cytosoliques comme les NLR (« NOD-like receptors ») ou les RLR (« Rig-like receptors ») (**Figure 13**).

Les TLR de surface (TLR2/1, TLR2/6, TLR4, TLR5) sont capables de détecter des motifs provenant de membranes bactériennes, virales ou protozoaires alors que les TLR présents dans l'endosome (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) se lient principalement aux acides nucléiques viraux et des bactéries intracellulaires (Maisonneuve et al. 2014). La liaison d'un agoniste sur un TLR induit différentes cascades de signalisation terminant par l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B ou IRF3, qui sont responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires ou des IFN de type I respectivement (Dowling & Mansell 2016). Il a été montré que les agonistes du TLR4 étaient également capables d'induire une endocytose dépendante de leur liaison sur le récepteur (Chaturvedi & Pierce 2009). Les TLR10 sont uniquement exprimés chez l'Homme et les TLR11-13 chez la souris, leurs agonistes et leurs rôles sont encore peu connus.

Les CLR sont des récepteurs uniquement présents à la membrane plasmique. Ils sont exprimés par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Il existe 4 grandes familles spécialisées dans la reconnaissance de résidus glucidiques (fucose, mannose, glucane) présentes à la surface des pathogènes fongiques : les récepteurs au mannose (MR), DC-SIGN, Dectin-1 et Dectin-2 (Geijtenbeek & Gringhuis 2009). Parmi les CLR, tous les récepteurs sauf le DC-SIGN induisent également une phagocytose lorsqu'ils se lient à leurs agonistes (Kerrigan & Brown 2009).

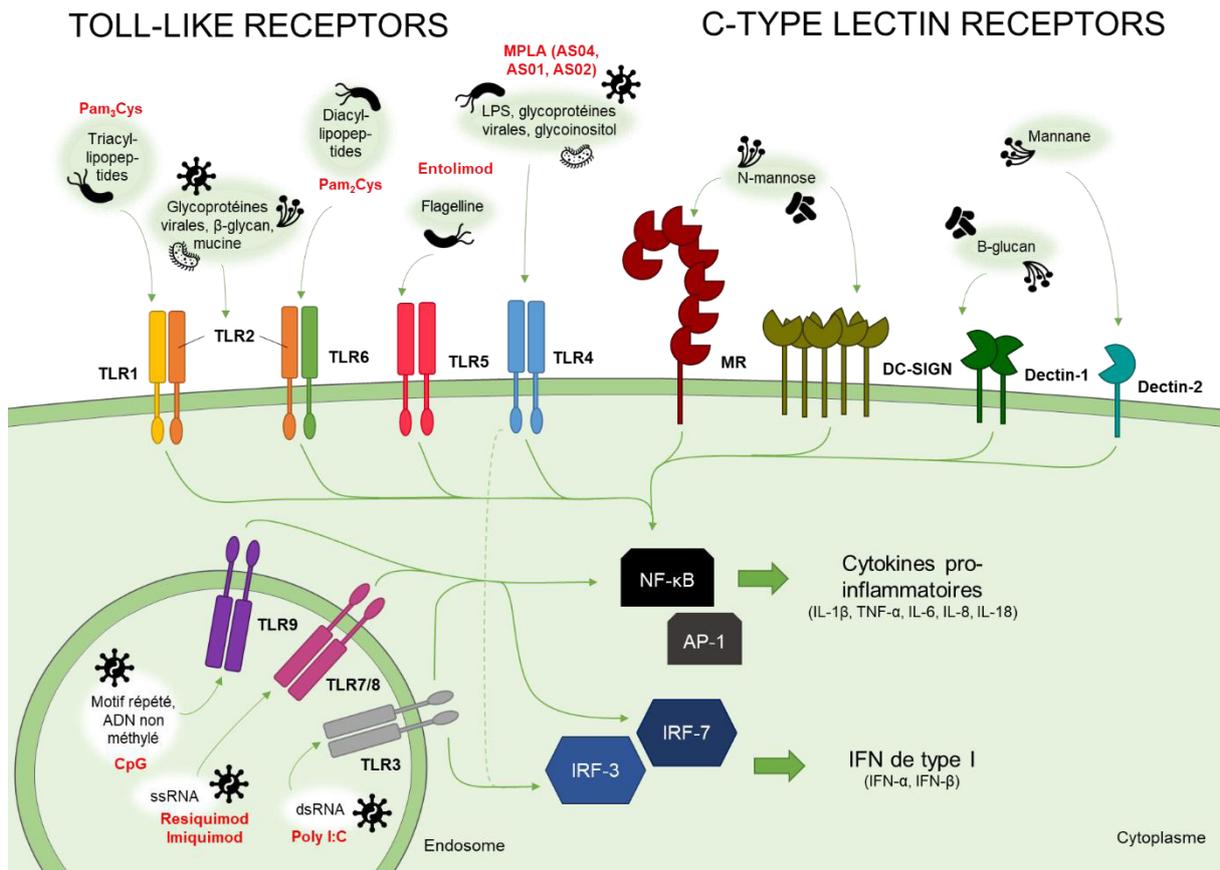


Figure 12. Les PRR membranaires.

Les deux catégories de PRR membranaires sont représentées sur cette figure (TLR et CLR) avec les principaux récepteurs et leurs agonistes pathogènes, leurs voies de signalisation et les principaux adjuvants utilisés pour les activer (noms écrits en rouge).

Les NLR sont des récepteurs cytosoliques capables de réagir à la présence de pathogènes intracellulaires, se retrouvant dans le cytoplasme après avoir échappé à l'endosome. Les deux récepteurs les plus étudiés sont NOD1 et NOD2 qui reconnaissent des motifs dérivés du peptidoglycane : le γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) ou le muramyl-dipeptide (MDP) respectivement (Takeuchi & Akira 2010). Leurs voies de signalisation permettent l'expression de cytokines pro-inflammatoires via NF- κ B ou AP-1. Les TLR étant également capables de reconnaître des peptidoglycanes et ayant des voies de signalisation très proches, il a déjà été montré que les récepteurs Toll-like et NOD-like étaient capables d'agir synergiquement pour activer les cellules dendritiques (Kawai & Akira 2011). Certains NLR forment des complexes appelés inflammasomes, qui vont induire le relargage des cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-18, IL-33) par l'intermédiaire de la caspase 1 (Kawai & Akira 2009). Le NLRP3 est l'inflammasome le mieux caractérisé, il peut réagir aux dommages cellulaires occasionnés par de nombreux

types de pathogènes (des mucines fongiques jusqu'à l'ARN viral), ses ligands endogènes n'ont cependant pas encore été découverts (Krishnaswamy et al. 2013).

Il existe également d'autres senseurs cytosoliques (RLR) capables de détecter la présence d'acides nucléiques provenant de pathogènes intracellulaires, principalement l'ARN viral. Les récepteurs de cette famille induisent l'expression de différents types d'interféron (type I, II et III) par l'intermédiaire des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B (Kawai & Akira 2009).

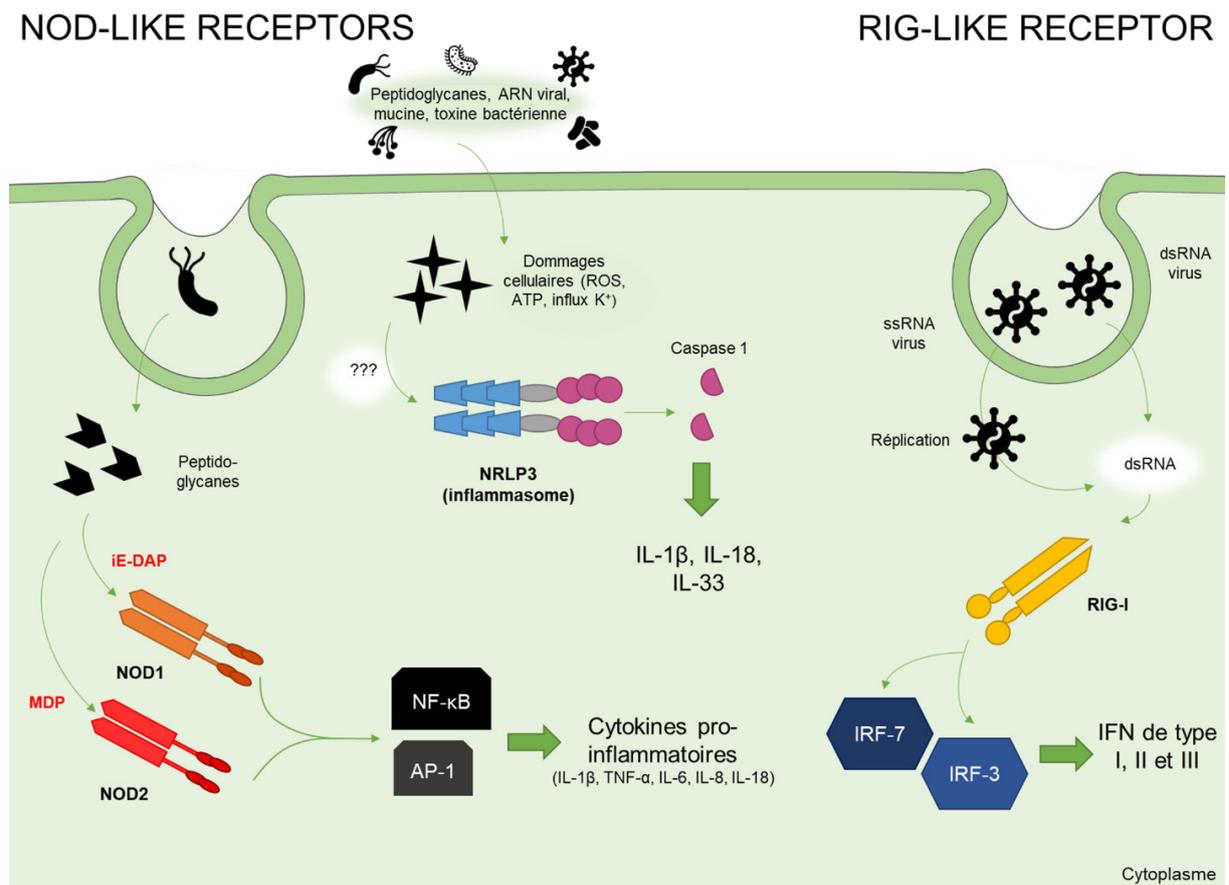


Figure 13. Les PRR cytosoliques.

Les deux principales catégories de PRR cytosoliques sont représentées (NLR et RLR) avec les récepteurs et leurs agonistes les plus étudiés, les voies de signalisation communes et les principaux adjuvants utilisés pour les activer (noms écrits en rouge).

3.3.2.2. Autres immunostimulants

En dehors de la liaison des PRR, la DC peut également être stimulée par certains sous-types cellulaires appartenant à l'immunité innée. Les NKT par exemple, peuvent

reconnaître, par l'intermédiaire de leur TCR invariant, des TAA lipidiques présentés par les molécules CD1d à la surface des DC (cf. §A.3.2, Introduction). Cette liaison va induire la maturation des DC et une très forte production de cytokines permettant de recruter les cellules NK et de favoriser la différenciation des CTL (Carreño et al. 2014). L' α -GalCer est un des principal antigène présenté par les molécules CD1d et a déjà été utilisé en tant qu'adjuvant en immunothérapie contre le cancer.

Certaines équipes ont également cherché à mimer la costimulation par les T helper en employant des molécules CD40-L (Diehl et al. 1999; Huang et al. 2004; Gupta et al. 2015; Xi et al. 2018). Ce type de molécules peut donc être considéré comme un adjuvant, agissant lors de l'activation secondaire de DC matures pour permettre la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL.

3.3.2.3. Les agonistes des TLR et NLR en vaccination

De nos jours, la plupart des agonistes de PRR utilisés en recherche sont des molécules synthétiques dérivées de bactéries, capables de se lier aux TLR ou NLR. De nombreux agonistes des TLR sont déjà commercialisés et employés dans des vaccins préventifs ou comme traitements anti-viraux ou anti-bactériens (Dowling & Mansell 2016). Certains de ces agonistes sont actuellement évalués en clinique pour une utilisation en tant qu'adjuvant dans des vaccins contre le cancer (Temizoz et al. 2016).

Le monophosphoryl lipid A (MPLA) est l'agoniste des PRR le plus utilisé en vaccination. Il s'agit de la moitié lipidique du lipopolysaccharide (LPS), un motif immunostimulant se trouvant sur la membrane extérieure des bactéries Gram négatives qui est reconnu par le TLR4 (Alving & Rao 2008). Le MPLA est cependant insoluble et doit donc être formulé de manière à améliorer sa biodisponibilité. Il peut, par exemple être adsorbé sur de l'alum, incorporé à une émulsion huile-dans-l'eau ou intégré dans des liposomes (cf. §C, Introduction).

Le MPLA est déjà commercialisé sous plusieurs formes adjuvantes par GlaxoSmithKline. Il a été combiné à un autre adjuvant le QS-21 (Quil A Saponin, *Quillaja saponaria*) dans une forme liposomique appelée AS01. Cette combinaison est capable d'induire une forte réponse de type Th1 ainsi que l'activation de cellules cytotoxiques chez la souris, le primate et l'Homme (Coccia et al. 2017). La forme AS02 contient le MPLA et QS-21 formulés dans une émulsion huile-dans-l'eau. La forme AS15 contient du MPLA, QS-21, des liposomes et un agoniste du TLR9 (CpG). Ces trois formes adjuvantes (AS01, AS02 et AS15) ont été comparées en association avec le peptide MAGE-A3 dans un

modèle préclinique qui a démontré la supériorité d'AS15 (Gérard et al. 2014). Malheureusement, deux essais cliniques réalisés chez des patients atteints de cancer pulmonaire de type CPNPC (NCT00480025) ou de mélanome (NCT00796445) ont dû être arrêtés pour manque d'efficacité de ce traitement. Finalement, la forme adjuvante la plus prometteuse est l'AS04 (mélange physique d'alum et de MPLA) qui a déjà été approuvée par la FDA pour son utilisation en vaccination contre le cancer (Cervarix®) et est actuellement évaluée avec différents peptides lors d'essais cliniques chez l'Homme (Dowling & Mansell 2016).

Le Pam₂CAG (*palmitoyl diacylated lipopeptide*), un agoniste synthétique développé au laboratoire, se lie au TLR2/6 et est dérivé de la partie N-terminale d'une lipoprotéine d'*E. coli*. Cet agoniste a prouvé qu'il était capable de stimuler la maturation de DC humaines et d'induire une réponse immunitaire antitumorale efficace et durable lorsqu'il était associé à un vaccin peptidique, dans un modèle préclinique de carcinome rénal précoce (Espuelas et al. 2005; Thomann et al. 2011). L'effet thérapeutique observé était protecteur ou thérapeutique et a été évalué contre des tumeurs sous-cutanées ou pulmonaires suivant des administrations vaccinales par voie nasale, pulmonaire ou sous-cutanée (Roth et al. 2005; Kakhi et al. 2015).

Récemment, les agonistes des NLR ont également été évalués en tant qu'adjuvants vaccinaux potentiels (Maisonneuve et al. 2014). En effet, il a été montré que les agonistes de NOD1 (iE-DAP) et de NOD2 (MDP) étaient capables d'induire une réponse de type Th2 ou Th1 selon leur combinaison à un second adjuvant. Par exemple, l'agoniste de NOD1 est capable d'interagir directement avec les lymphocytes T CD8⁺ en augmentant leur prolifération (Mercier et al. 2012), d'activer les NKT (Selvanantham et al. 2013) et induit également une forte polarisation du système immunitaire vers une réponse Th1/Th17 en synergie avec un agoniste du TLR2 (Fritz et al. 2007).

3.3.3. *Importance du choix de l'adjuvant*

Ces dernières années, il est devenu évident que le choix d'un adjuvant adéquat est aussi essentiel que la sélection d'antigènes tumoraux appropriés, lors du développement de vaccins thérapeutiques contre le cancer. En effet, les adjuvants utilisés dans les vaccins antitumoraux doivent être capables d'induire une réponse immunitaire puissante de type Th1. Cependant, les adjuvants utilisés classiquement en vaccination humaine polarisent plutôt une réponse de type Th2, c'est le cas de l'alum, ou une faible réponse de

type Th1 dans le cas du Montanide® (Brewer et al. 1999; Knudsen et al. 2016). L'utilisation d'agonistes des TLR et NLR représentent, à ce jour, la meilleure option pour le développement d'adjuvants non toxiques, capables d'activer différentes voies de l'immunité innée et d'engendrer une réponse adaptée au profil immunitaire recherché (Maisonneuve et al. 2014).

Il est intéressant de noter que l'hétérogénéité génétique entre plusieurs individus peut influencer leur capacité à répondre efficacement à une formulation adjuvannée (Poland et al. 2007). Par exemple, un polymorphisme des gènes codants pour les TLR a été associé à des différences d'efficacité observées chez des patients traités avec le vaccin préventif contre la rougeole, la rubéole et les oreillons (Dhiman et al. 2008). Ces différences seraient donc susceptibles d'influencer l'efficacité des vaccins antitumoraux contenant des agonistes des TLR, d'où l'importance de bien comprendre les mécanismes d'action de ces adjuvants et d'être en mesure de détecter ces polymorphismes chez les patients pour prévenir l'échec d'un traitement.

De plus, des différences dans le niveau d'expression des TLR ont été observées chez des leucocytes présents dans différents tissus humains (Zarembek & Godowski 2002). Des variations entre les différents sous-types de DC chez l'homme (Schreibelt et al. 2010) ont également été montrées, laissant envisager que certains agonistes seraient mieux reconnus par certains types cellulaires ou tissulaires. Effectivement, les agonistes du TLR4 et du TLR9 sont très efficaces pour induire une immunité au niveau des muqueuses (Rhee et al. 2012) alors que les agonistes du TLR2 et TLR5 sont plutôt efficaces pour maintenir l'homéostasie de l'immunité intestinale dans le cas des maladies auto-immunes (Kamdar et al. 2013).

De plus, la voie d'administration du vaccin contenant un agoniste des TLR influence également son efficacité à induire une réponse immunitaire spécifique contre les antigènes associés. Par exemple, le MPLA (TLR4) n'est pas efficace par voie sublinguale mais induit une réponse immunitaire systémique lorsqu'il est injecté par voie sous-cutanée ou intranasale. Inversement, le CpG (TLR3) n'est pas efficace lorsqu'il est injecté par voie s.c. mais est efficace suivant les deux autres modes d'administration (Buffa et al. 2012).

Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ce nouveau type d'adjuvants et de leur association permettrait donc d'obtenir un panel d'agonistes pour la conception de vaccins personnalisés au patient, au type de tumeur et à sa localisation.

Comme précisé précédemment dans ce chapitre, les peptides sont sujets à la dégradation et leur petite taille font qu'ils peuvent être endocytés par des phagocytes autres que les DC. C'est pourquoi les vaccins peptidiques contenant des adjuvants immunostimulants doivent être formulés avec des **vecteurs nanoparticulaires**, tels que les liposomes, capables de protéger les peptides courts et/ou d'augmenter leur délivrance aux cellules dendritiques.

C. Liposomes et vaccination

1. Vaccins nanoparticulaires

Ces trente dernières années, les nanoparticules ont fait l'objet de recherches intensives dans le domaine du cancer, afin d'exploiter leur capacité à vectoriser des molécules actives ou contrastantes à visée chimiothérapeutique, diagnostique ou théranostique (Sun et al. 2014; Tietze et al. 2015; Connor & Broome 2018; Lin et al. 2018). Parmi ces travaux, l'utilisation des nanoparticules afin de cibler le système immunitaire et délivrer des antigènes tumoraux, est une approche de plus en plus étudiée pour permettre le développement de nouveaux vaccins thérapeutiques (Gregory et al. 2013).

1.1. Définitions

Le NIH (*National Institute of Health*) définit les nanoparticules comme des particules possédant au moins une de leur dimension comprise entre 1 et 100 nm. Parallèlement, d'après la norme ISO Technical Specification 80004, une nanoparticule est définie comme un nano-objet d'une taille inférieure à 100 nm dans les trois dimensions (largeur, hauteur et profondeur), dont le rapport entre l'axe le plus court et le plus long ne dépasse pas un facteur 3. Ces définitions excluent donc les particules sphériques ayant une taille comprise entre 100 et 1000 nm (particules submicroniques), ainsi que les objets ayant une forme atypique, tels que les nanotubes ou les nanofibres.

Cependant, dans la littérature associée à la nanomédecine, par abus de langage et pour simplifier, le terme de « nanoparticules » est souvent attribué à tous les types de vecteurs ayant un diamètre, ou au moins une dimension, inférieur au micromètre. Ce terme sera donc employé comme tel dans le reste du manuscrit.

Les nanoparticules sont des objets synthétiques formés à partir de différents matériaux (polymères, lipides, métaux) et présentant des structures variables (**Figure 14**). Il existe trois grandes catégories de nanovecteurs : les nanoparticules à base de polymères, inorganiques ou lipidiques. Les exemples donnés ci-après se concentreront sur les nanoparticules utilisées dans le domaine médical et en particulier en vaccination.

1.2. Les nanoparticules à base de polymères

Les nanoparticules à base de polymères sont préférentiellement formées de matériaux biodégradables, comme par exemple l'acide polylactique (PLA) et son copolymère le poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), qui peuvent former des nanocapsules (système réservoir) ou des nanosphères (système matriciel) (**Figure 14A**). Leurs tailles varient entre 30 et 500 nm en fonction de leur méthode de formulation et de leur composition (Gregory et al. 2013). Ces polymères sont dégradés *in vivo*, entraînant un relargage progressif et ciblé d'antigènes viraux ou tumoraux (Johansen et al. 2007; Peres et al. 2017). Les dendrimères sont également des nanoparticules synthétiques formées principalement de polymères peptidiques (contenant les épitopes tumoraux) dans le domaine de la vaccination. Ces nanoparticules sont très petites (de l'ordre de 20 nm) et contiennent un noyau pouvant avoir des propriétés adjuvantes, accroché à un nombre variable d'hélices peptidiques antigéniques (Skwarczynski et al. 2010).

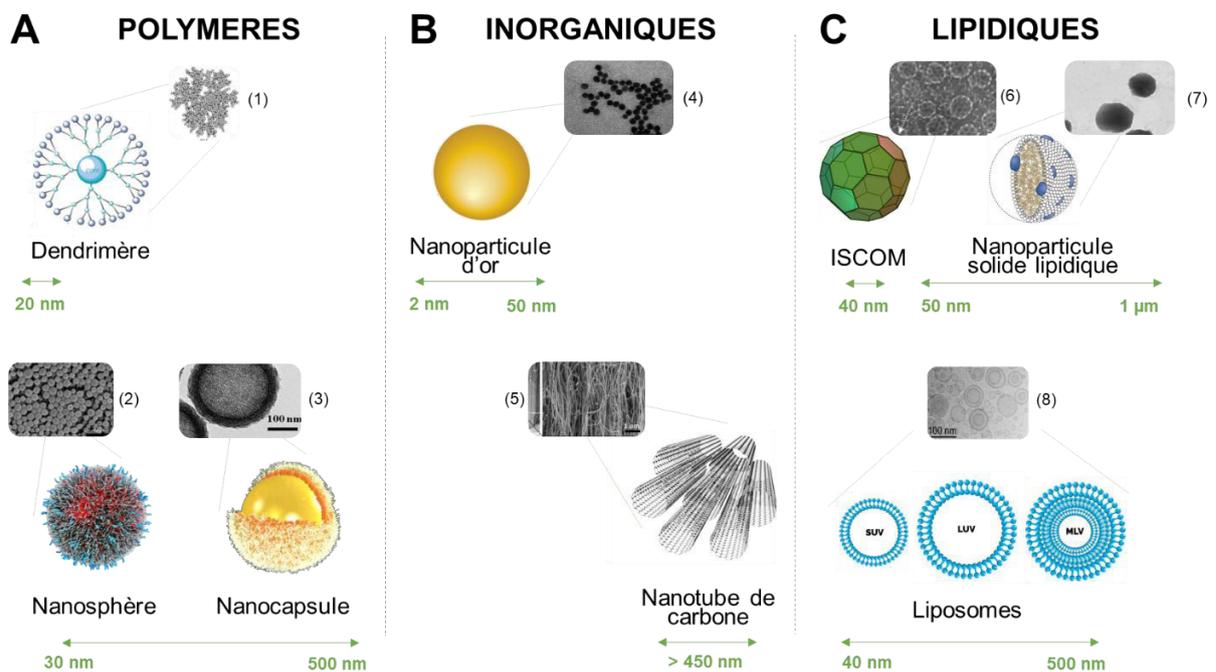


Figure 14. Principaux vecteurs nanoparticulaires à visée vaccinale.

(1) Bielinska A et al. (2012). J Nanoparticle Res. (2) Xi J et al. (2017). Int J Nanomedicine. (3) Olyveira GM et al. (2012). J Nanosci Nanotechnol. (4) Rieznichenko LS et al. (2012). Exp Oncol. (5) Souier T et al. (2012) Nanotechnology. (6) Myschik J et al. (2006). Micron. (7) Olyveira GM et al. (2012). J Nanosci Nanotechnol. (8) Le VM et al. (2017). Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology.

1.3. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules non dégradables, à base de métaux (or, carbone, silice) sont très utilisées en thérapie et diagnostic contre le cancer, bien qu'étant moins représentées dans le domaine de la vaccination (Luo et al. 2015) (**Figure 14B**). Ces structures vectorisent généralement des antigènes qui ont été adsorbés sur leur surface. Les nanoparticules d'or ont une forme sphérique monodisperse et un petit diamètre (2 à 50 nm), essentiels pour leur permettre d'être recouvertes de manière reproductible et uniforme par les antigènes (Saupe et al. 2006). Les nanovecteurs de carbone ou de silice ont en général une longueur supérieure à 450 nm et une forme allongée en raison de leur méthode de formulation par couches (nanotubes). Ils ont principalement été utilisés pour la délivrance d'antigènes par voie orale, la composition des nanoparticules permettant une meilleure protection contre l'acide gastrique (Wang et al. 2011)

1.4. Les nanoparticules lipidiques

Dans la catégorie des nanoparticules lipidiques (**Figure 14C**), les ISCOM (immunostimulating complex) sont des vecteurs colloïdaux d'environ 40 nm formés à partir de saponine et contenant un arrangement de micelles de forme dodécaèdre (Barr et al. 1998). Ces nanoparticules ont été principalement utilisées pour leurs propriétés vectrices ainsi que pour leur capacité à encapsuler des protéines virales ou bactériennes dans le cadre de vaccins préventifs (Morein & Simons 1985; Claassen & Osterhaus 1992). Ces nanoparticules formées de carbohydre de saponine ont des propriétés adjuvantes intrinsèques et peuvent se lier au DEC-205 exprimé par les DC (McEntee et al. 2015).

Les lipides peuvent également être employés pour former des nanoparticules lipidiques solides (NLS) ou des nano-émulsions, toutes deux employées en vaccination (Puri et al. 2009). Les NLS sont composées d'un cœur hydrophobe de triglycérides, qui ont une forme solide à température ambiante ou corporelle. Leur taille peut varier de 50 nm à 1 µm. Elles possèdent une matrice de cristal lipidique, qui permet l'emprisonnement des antigènes entre les chaînes d'acides gras. Finalement, les liposomes sont des vésicules composées d'au moins une bicouche lipidique et d'un cœur aqueux. Ces structures peuvent avoir une taille allant de 20 nm à 10 µm, en fonction de leur composition et de la méthode de formulation employée (Krishnamachari et al. 2011). Leurs propriétés et avantages en tant que nanovecteurs pour la vaccination sont développés dans les paragraphes suivants.

2. Les liposomes

La capacité des liposomes à vectoriser des antigènes pour permettre l'induction d'une réponse immunitaire spécifique a été montrée pour la première fois par Gregoriadis et Allison (Allison & Gregoriadis 1974). Depuis, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux liposomes et ont exploité leurs nombreuses capacités afin de développer des formulations vaccinales multivalentes et originales.

2.1. Propriétés physicochimiques des liposomes

2.1.1. Généralités

Les liposomes sont des vésicules sphériques, composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques, contenant un cœur aqueux. Ces nanoparticules sont principalement composées de phospholipides naturels ou synthétiques et de cholestérol, qui augmente la stabilité des membranes en modulant leur fluidité.

Il existe plusieurs méthodes de formulation des liposomes qui diffèrent uniquement par leur manière de transférer les lipides d'un solvant organique à un tampon aqueux, où les lipides vont s'auto-assembler (Laouini et al. 2012). Les phospholipides (PL) sont des molécules amphipathiques ; leur tête hydrophile est attirée par les milieux aqueux alors que leurs queues hydrophobes formées d'acides gras sont repoussées et interagissent avec les autres chaînes carbonées aliphatiques (Bozzuto & Molinari 2015) (**Figure 15**). Le caractère amphiphile des PL est à l'origine de la formation spontanée de bicouches

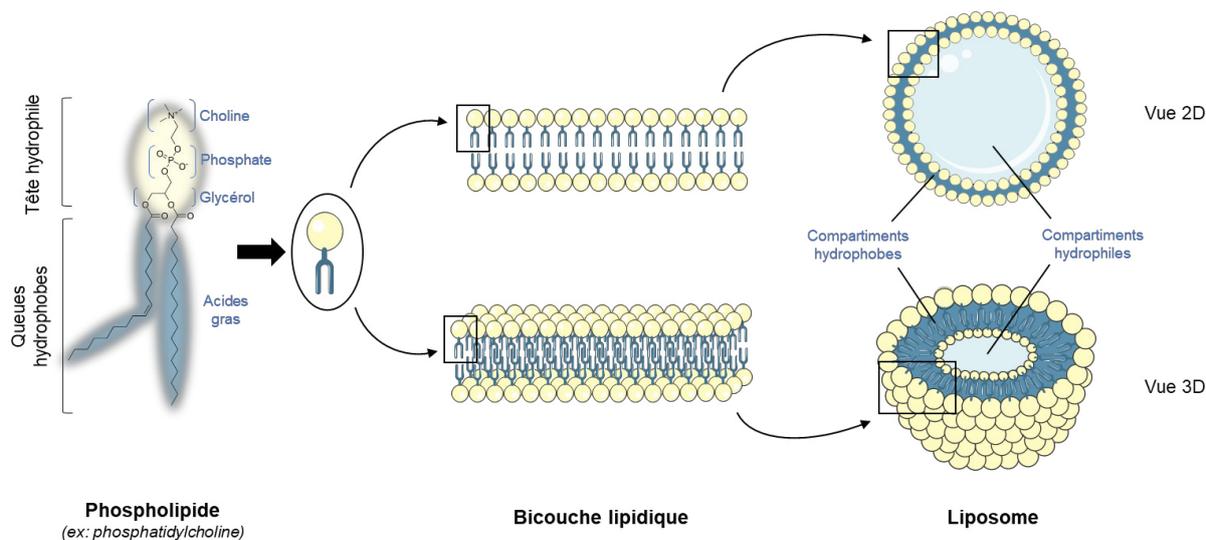


Figure 15. Représentation schématique de la structure des liposomes.

lipidiques dans des milieux aqueux. Les chaînes hydrophobes, se faisant face, forment un compartiment intermédiaire lipophile situé à l'intérieur des membranes, qui est entouré d'un environnement interne et externe aqueux.

2.1.2. Taille et lamellarité

Lors de la formation des membranes liposomiques, plusieurs bicouches peuvent se former les unes autour des autres, donnant lieu à des liposomes multilamellaires de taille et lamellarité variables (MLV, multilamellar vesicles). En fonction de la technique de formulation employée et de sa composition, le liposome peut également piéger des volumes aqueux différents, induisant la formation de liposomes unilamellaires de plusieurs tailles : « small », « large » ou « giant » (SUV, LUV, et GUV respectivement). La lamellarité ainsi que la taille des liposomes peuvent être modulées en fonction de la méthode de formulation, ces deux paramètres jouant un rôle déterminant dans leur capacité à vectoriser des antigènes et leur interaction avec le système immunitaire (Watson et al. 2012) (**Figure 16**).

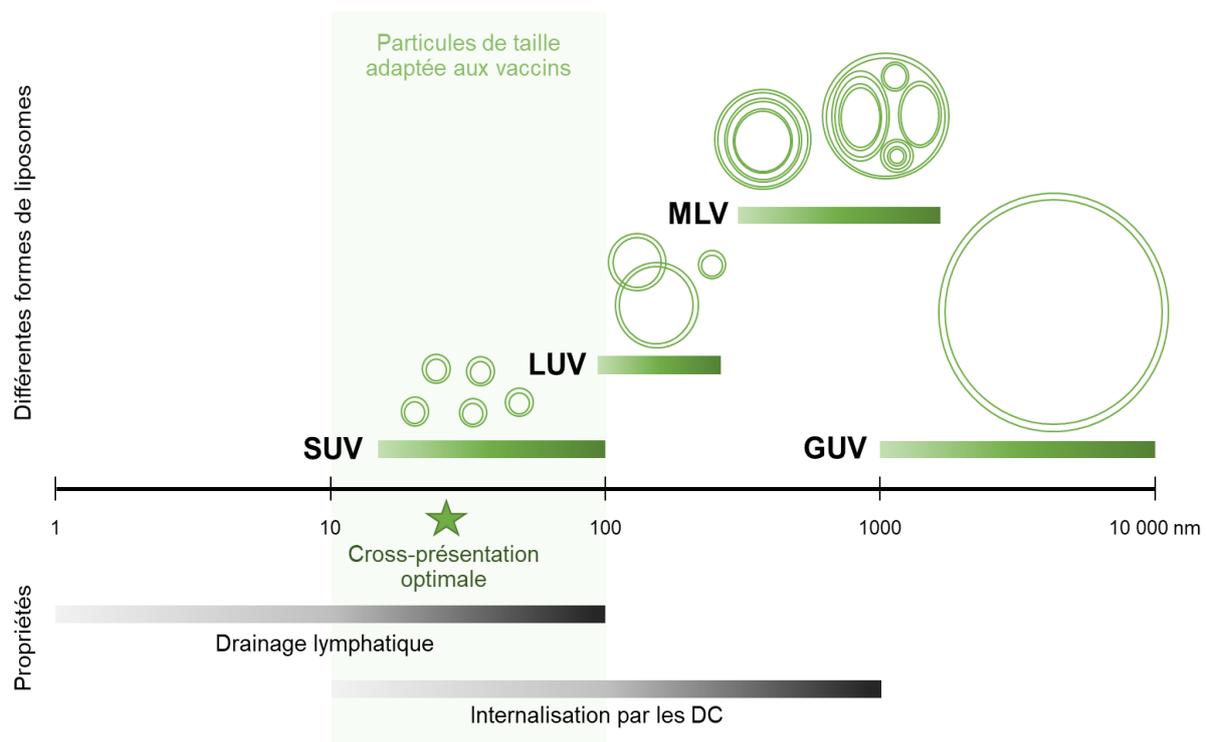


Figure 16. Structure de différentes formes de liposomes, associée à leurs propriétés de ciblage

La taille des liposomes est indiquée sur une échelle logarithmique. Une nanoparticule de taille optimale doit être internalisée efficacement par les DC, pouvoir être drainée par le système lymphatique et ciblée préférentiellement les DC spécialisées pour la cross-présentation. D'après Bachmann & Jennings 2010.

SUV : *small unilamellar vesicle*, LUV : *large unilamellar vesicle*, MLV : *multilamellar vesicle*, GUV : *giant unilamellar vesicle*, DC : cellule dendritique.

Les GUV ne seront pas discutés dans ce manuscrit, étant classés dans la catégorie des microparticules à cause de leur taille supérieure au micromètre. Les MLV sont des suspensions liposomiques très hétérogènes en terme de taille et d'organisation, ayant un diamètre compris entre 500 nm et 5 μ M. Ces liposomes possèdent plusieurs compartiments et un plus grand volume hydrophobe en raison de leur multilamellarité, faisant d'eux de très bons vecteurs pour les molécules hydrophobes (Bozzuto & Molinari 2015). Les MLV ont été plutôt utilisés pour la vectorisation d'ADN ou d'adjuvants lipophiles en vaccination vétérinaire (Schwendener 2014). Les LUV contiennent un plus gros volume aqueux (en moyenne 30 fois plus que les SUV et 4 fois plus que les MLV), leur conférant une grande capacité à encapsuler de grosses quantités de molécules hydrophiles (Szoka & Papahadjopoulos 1978). Ils sont également plus stables que les SUV et se conservent plus longtemps (du Plessis et al. 1996). Cependant, leur taille supérieure à 100 nm n'est pas idéale pour favoriser une interaction avec les CPA, indispensable dans le cadre de la vaccination.

En effet, les DC sont capables d'internaliser des particules de taille similaire aux pathogènes (20-100 nm pour les virus, autour du μ m pour les bactéries), mais le transport lymphatique n'est possible qu'avec des particules d'une taille inférieure à 200 nm (Bachmann & Jennings 2010) (**Figure 16**). Ainsi, les liposomes de grande taille doivent être internalisés par les CPA présentes au site d'injection alors que les particules de 20 à 200 nm peuvent être drainées passivement jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles seront prises en charge par les DC résidentes (Khong & Overwijk 2016b). Il a également été montré que la taille optimale pour l'internalisation de particules par les DC spécialisées dans la cross-présentation était de 40 nm (Fifis et al. 2004). Face à ces différents arguments, les SUV représentent donc la meilleure option pour une délivrance efficace d'épitopes CD4 et CD8 au système immunitaire. En plus de leur petite taille, les suspensions de SUV sont généralement très homogènes, grâce à l'utilisation de méthodes de formulation fiables et reproductibles (Brandl 2001). Les SUV peuvent également être produits à partir de la technique de microfluidisation, qui est pour l'instant le procédé industriel le plus prometteur pour la formulation en grande quantité de suspensions liposomiques homogènes d'une taille inférieure à 100 nm (Yu et al. 2009).

2.1.3. *Potentiel zêta*

Le potentiel zêta, qui est le reflet de la charge de surface des liposomes, dépend principalement de la composition lipidique de ses membranes. Ainsi, des liposomes

contenant de la phosphatidylsérine ou du phosphatidylglycérol posséderont un potentiel zêta négatif alors qu'il sera positif si leur bicouche contient de la stéarylamine.

La plupart des études s'accordent à dire que les liposomes neutres sont très instables et ont une tendance accrue à l'agrégation (Bozzuto & Molinari 2015). L'influence de la charge sur le potentiel vaccinal des liposomes demeure cependant un sujet de débat, plusieurs études se sont penchées sur la question et ont obtenu des résultats contradictoires ou non concluants (Allison & Gregoriadis 1974; Campbell 1983; Kraaijeveld et al. 1984; Nakanishi et al. 1997). Ainsi, certains auteurs ont montré que les liposomes chargés positivement (cationiques) étaient plus efficacement phagocytés par les DC, du fait de la nature anionique de la membrane cellulaire et engendraient un « effet-dépôt » plus important sur le site d'injection (Nakanishi et al. 1997; Henriksen-Lacey et al. 2010). Récemment, une autre équipe de recherche a contredit cette observation en montrant que les liposomes étaient drainés jusqu'aux ganglions lymphatiques et internalisés par les CPA, indépendamment de leur charge (Fromen et al. 2016).

Les liposomes chargés négativement (anioniques) ont comme principal inconvénient leur forte interaction avec les protéines du sang et les opsonines telles que le complément, ce qui induit leur rapide clairance et phagocytose par le système réticulo-endothélial (RES) (Ishida et al. 2001). Ce désavantage devient cependant un avantage dans le cas de la vaccination, où la phagocytose des liposomes par les DC est l'objectif principal. De plus, la toxicité des liposomes cationiques a été reportée par plusieurs équipes, qui ont observé différents effets secondaires délétères causés par l'induction d'une réponse pro-inflammatoire puissante associée au relargage de dérivés réactifs de l'oxygène (Campbell 1983; Lonez et al. 2012). Pour ces différentes raisons, l'intérêt se porte désormais majoritairement sur l'exploitation des liposomes anioniques comme vecteurs vaccinaux.

2.1.4. *Association des antigènes et des adjuvants*

Les antigènes sont généralement de type peptidique (hydrophiles ou hydrophobes) alors que les adjuvants, tels que les agonistes des TLR ou NLR, sont généralement dérivés de molécules membranaires (hydrophobes ou amphiphiles). Grâce à leur forme vésiculaire, contenant des compartiments hydrophiles et hydrophobes, les liposomes sont capables de vectoriser des molécules ayant des propriétés physicochimiques différentes. Différentes méthodes d'association peuvent être employées pour conjuguer des composants immunostimulants aux liposomes (Tandrup Schmidt et al. 2016) (**Figure 17**).

En réhydratant un film lipidique avec une solution aqueuse contenant des molécules hydrophiles, les molécules se retrouvent encapsulées à l'intérieur du cœur aqueux des liposomes (**Figure 17a**). Cependant, des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que l'encapsulation d'épitopes peptidiques dans le cœur des liposomes n'est pas la solution la plus favorable à l'induction d'une réponse immunitaire (Frisch et al. 1991). De plus, certains peptides ont un faible taux d'encapsulation (ex : le peptide E7), ce qui occasionne le gaspillage de molécules non encapsulées par les liposomes, éliminées lors de la dialyse (Chen & Huang 2008).

Les peptides chargés négativement peuvent également être adsorbés à la surface par interactions électrostatiques avec les résidus chargés des liposomes cationiques (Henriksen-Lacey et al. 2010) (**Figure 17b**). Cependant, une adsorption trop faible peut entraîner la libération prématurée des antigènes *in vivo* alors qu'une adsorption trop forte induit l'agrégation des liposomes lorsque les charges opposées ne sont pas correctement équilibrées (Hamborg et al. 2013).

Finalement, une des méthodes les plus fiables pour s'assurer de la conjugaison d'un peptide à un liposome est leur liaison covalente à une ancre amphiphile pré-incorporée dans la bicouche lipidique (**Figure 17c**). Cette ancre doit être fonctionnalisée avec un groupement permettant le couplage rapide et stable des peptides à la surface du liposome, comme par exemple le maléimide se liant aux thiols (Roth et al. 2004; Spanedda et al. 2017). Bien qu'il soit admis que l'encapsulation d'antigènes permet une meilleure protection contre la dégradation par des protéases, il a été montré que les liposomes contenant des antigènes encapsulés ou conjugués à leur surface permettait l'induction d'une réponse immunitaire cytotoxique équivalente (Taneichi et al. 2006; Chen et al. 2012; Cruz et al. 2014; Maji et al. 2016). Le seul inconvénient de cette méthode est la nécessité de modifier la séquence peptidique pour rajouter une fonction de couplage (ex : ajout d'une cystéine), lorsque celle-ci n'est pas déjà présente dans la séquence, ce qui pourrait modifier l'antigénicité du peptide.

Certains agonistes amphiphiles des TLR et NLR miment des composants bactériens membranaires, qui peuvent être directement incorporés dans la membrane des liposomes (**Figure 17d**). Ces agonistes sont mélangés aux lipides composant les liposomes dans un solvant organique, qui sera évaporé. Le film lipidique ainsi obtenu sera réhydraté avec un tampon aqueux, ce qui conduit à la formation de vésicules lipidiques contenant les

molécules amphiphiles dans leur bicouche. Le taux d'incorporation avec cette méthode est quasiment total. Par exemple, il a été montré que l'agoniste du TLR4 (MPLA) était incorporé à plus de 99% par rapport à la quantité initiale ajoutée avant la formation du film lipidique (Dijkstra et al. 1988). L'association du MPLA aux liposomes permet également une meilleure internalisation par les DC, comparé à sa forme soluble, et induit la différenciation d'un plus grand nombre de CTL (Alving & Rao 2008; Boks et al. 2015).

Les molécules hydrophobes peuvent également être intégrées dans la membrane par ajout goutte à goutte dans une suspension de liposomes chauffée pour atteindre la phase de cristal liquide où la membrane est plus fluide (**Figure 17e**). Cette technique a été utilisée pour incorporer de l'acide rétinoïque et des lipoprotéines dans la membrane de liposomes contenant du MPLA, et a permis d'atteindre des taux d'incorporation de 75 à 100% (Watson et al. 2009).

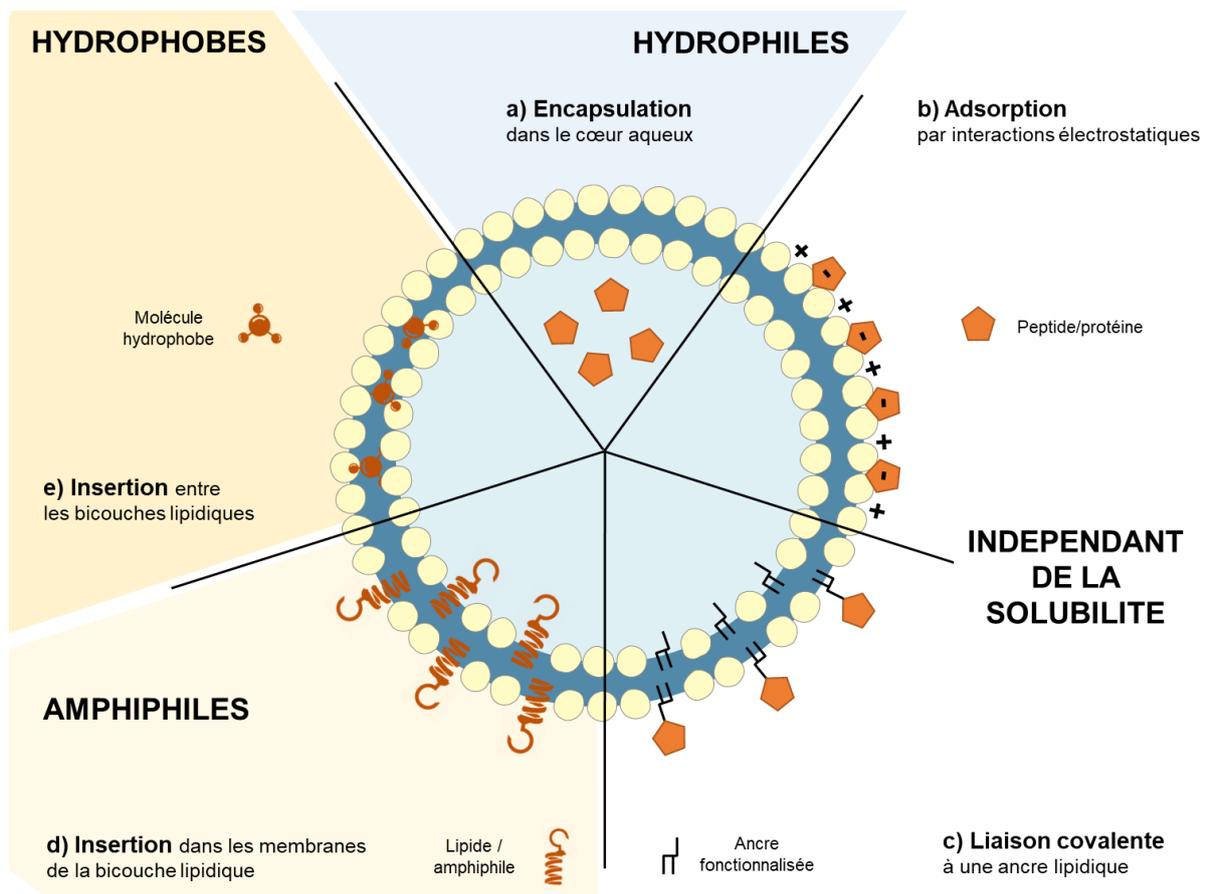


Figure 17. Méthodes d'association de composants vaccinaux aux liposomes.

Les composants vaccinaux peuvent être a) encapsulés, b) adsorbés, c) liés covalentement à la surface, d) incorporés dans la membrane liposomique ou e) insérés entre les bicouches lipidiques des liposomes. La solubilité des composants vaccinaux (hydrophile, amphiphile ou hydrophobe) ou leur réactivité chimique peut influencer le choix de la méthode de conjugaison. D'après (Tandrup Schmidt et al. 2016).

Ainsi, les propriétés physicochimiques d'une molécule à vectoriser peuvent influencer la stratégie de couplage liposomes. Lorsque c'est possible, il est nécessaire de prioriser l'attachement à la surface des peptides et l'insertion des molécules amphiphiles dès la formation du film lipidique, permettant l'obtention d'une formulation liposomique de meilleure qualité et plus immunogène (Tandrup Schmidt et al. 2016).

2.2. Intérêts des liposomes en vaccination

Parmi les différentes catégories de nanoparticules utilisées en vaccination, les liposomes possèdent de nombreux atouts faisant de ce nanovecteur un outil très apprécié dans le domaine de l'immunothérapie des cancers (Mallick & Choi 2014).

2.2.1. *Biocompatibilité*

L'un des principaux avantages des liposomes comparés à d'autres nanovecteurs est leur biocompatibilité et leur rapide dégradation dans l'organisme. En effet, les liposomes dits « conventionnels » sont formés de lipides classiquement retrouvés dans les membranes cellulaires des mammifères (Gregory et al. 2013). Après internalisation, les phospholipides et le cholestérol des membranes liposomiques vont s'échapper de l'endosome, être dégradés dans le cytoplasme ou être incorporés aux membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Un et al. 2012). Ces lipides seront ensuite excrétés ou dégradés par la cellule selon différents processus, permettant une clairance totale 7h après internalisation (Harashima et al. 1995).

2.2.2. *Vectorisation*

Tout d'abord, le principal intérêt des vaccins nanoparticulaires est leur capacité à transporter les antigènes en quantité suffisante pour induire une réponse immunitaire efficace ainsi que leur protection contre les enzymes de dégradation présentes dans les milieux physiologiques. Lors des précédents paragraphes, nous avons vu que l'encapsulation dans le cœur aqueux ou l'adsorption de peptides à la surface de liposomes présentaient plusieurs désavantages et occasionnaient une perte non négligeable de composants lors de la formulation. La conjugaison de peptides aux liposomes serait donc une méthode d'association plus fiable, qui permet de diminuer de 25 fois la dose optimale d'antigènes, comparée à un traitement avec des antigènes solubles ou encapsulés dans des liposomes (Uchida & Taneichi 2014).

De plus, l'association de peptides à la surface de liposomes permet de ralentir l'hydrolyse des peptides dans l'endosome. Cette libération prolongée permet un apport continu d'épitopes peptidiques vers les voies d'apprêtement sur le CMH-I et CMH-II (Ma et al. 2011). Il a été postulé que ce processus augmente le temps de présentation des antigènes par la DC, lui accordant plus de temps pour migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et entreprendre un mécanisme de cross-présentation (Shen et al. 2006).

2.2.3. *Versatilité*

La versatilité des liposomes est également un des atouts majeurs de ce type de nanoparticules, dont les caractéristiques intrinsèques peuvent être modulées pour conférer aux liposomes différentes propriétés en fonction de leur utilisation et du type de molécules à vectoriser. La taille, la composition en lipides, la structure et la charge de surface peuvent être modifiées, comme décrits dans le §C.2.1 de l'introduction.

Les liposomes sont également des nanoparticules très versatiles qui ont la possibilité de vectoriser des molécules ayant des propriétés physicochimiques très différentes (**Figure 17**). Les liposomes « conventionnels » n'étant pas immunogènes, cette versatilité peut être exploitée pour associer un adjuvant immunostimulant aux épitopes peptidiques CD4 et CD8 (Krishnamachari et al. 2011). L'association des trois éléments indispensables à l'obtention d'une réponse antitumorale sur une même nanoparticule lipidique permet ainsi d'obtenir une construction multivalente ayant un pouvoir vaccinal plus efficace qu'un mélange physique de ces mêmes composants (Tandrup Schmidt et al. 2016).

2.2.4. *Capture, internalisation et cross-présentation par les DC*

Un atout important des liposomes est également leur capacité à être capturés et internalisés par les cellules présentatrices de l'antigène, notamment par les DC, grâce à leur forme particulière et leur taille nanométrique (**Figure 18**).

Les liposomes interagissent de différentes manières à la surface des cellules, la liaison pouvant se faire par adsorption à la membrane plasmique ou liaison spécifique à des récepteurs (Bozzuto & Molinari 2015) (**Figure 18A**). Dans certains cas, les liposomes vont être dégradés par les enzymes ou les lipases extracellulaires entraînant le relargage de leurs composants à l'extérieur de la cellule et leur diffusion à travers la membrane plasmique, s'ils sont peu hydrophiles (Itakura et al. 2014) (**Figure 18B**). Certains types de liposomes, dits fusogènes, contiennent des lipides particuliers qui permettent la fusion à

la membrane plasmique et la libération du contenu des liposomes dans le cytosol (Yoshikawa et al. 2006) (**Figure 18C**). Le mécanisme principal de délivrance des antigènes par les liposomes reste cependant leur internalisation par endocytose ou phagocytose en fonction de leur taille (Xiang et al. 2006; Tanaka et al. 2010). Les grandes particules (0,25 à 1 μm) sont phagocytées par les monocytes et macrophages et induisent la production de TNF- α alors que les particules d'une taille inférieure à 200 nm sont prises en charge par les DC qui vont les internaliser par endocytose ou pinocytose et produire de l'IFN- γ (Joshi et al. 2012) (**Figure 18D,E**). Suite à l'endocytose des liposomes, soit les endosomes vont fusionner avec un lysosome induisant la dégradation des antigènes dans l'endo-lysosome (**Figure 18F**), soit les liposomes vont fusionner ou déstabiliser l'endosome précoce et libérer leur contenu dans le cytosol (Watson et al. 2012) (**Figure 18G**).

Il a également été montré que les liposomes, d'une taille de 40 nm comportant un épitope CD8, étaient plus efficacement internalisés par les DC spécialisées dans la cross-présentation de cet épitope sur le CMH-I (Tanaka et al. 2010). Ce mécanisme est d'autant plus efficace si les antigènes sont couplés à la surface des liposomes, faisant de ce vecteur un outil apprécié pour le développement de vaccins antitumoraux (Taneichi et al. 2006; Belizaire & Unanue 2009).

2.2.5. *Fonctionnalisation*

Finalement, il est également possible de fonctionnaliser la surface des liposomes avec des molécules leur octroyant divers atouts supplémentaires, tels que : le ciblage actif des DC, une meilleure internalisation, ou une protection dans le milieu circulant. Comme décrit précédemment, des adjuvants immunostimulants (agonistes des PRR) peuvent être ajoutés dans la composition des liposomes pour permettre la maturation et le ciblage des DC (Boks et al. 2015). Des anticorps ciblant les récepteurs exprimés par les CPA (eg. DEC-205) ou des ligands ciblant les récepteurs des lectines (ex : mannose) ont également été conjugués à la surface des liposomes pour permettre la délivrance active d'antigènes tumoraux (van Broekhoven et al. 2004; Espuelas et al. 2008; Kelly et al. 2011).

La combinaison de liposomes avec des « *cell penetrating peptides* » permet d'augmenter de plus de 30 fois leur interaction à des monocytes ou des neutrophiles *in vitro* (Juliano et al. 2009; Karathanasis et al. 2009). Une protéine de fusion provenant du virus de Sendaï a également été utilisée pour permettre la fusion des liposomes à la surface des cellules et la délivrance de leur contenu directement dans le cytoplasme

(Yoshikawa et al. 2006) (Erreur ! Source du renvoi introuvable. **C**). Des liposomes « furtifs » ont été développés portant par exemple un polymère d'éthylène glycol (PEG) à leur surface, ce qui leur permet d'échapper à l'opsonisation et à la phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial (Krishnamachari et al. 2011). Ce type de nanovecteurs a d'abord été utilisé pour la délivrance d'agents chimiothérapeutiques, son utilisation s'est finalement généralisée à la vaccination. Il a été montré que des vaccins liposomiques injectés par voie i.v., recouverts de PEG, permettaient d'augmenter le temps de circulation des liposomes et induisaient une plus forte prolifération des lymphocytes T CD8⁺, associée à l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale protectrice (Ignatius et al. 2000; van Broekhoven et al. 2004).

Ainsi, les liposomes sont des outils très utiles et particulièrement adaptés au développement de vaccins contre le cancer. En plus d'être capables de vectoriser et/ou de protéger les antigènes, les liposomes sont également très efficacement internalisés par les CPA de manière passive, en fonction de leurs propriétés intrinsèques (taille, charge, composition). Ces nanoparticules peuvent être utilisées pour co-administrer des épitopes et adjuvants, permettant l'induction d'une réponse immunitaire puissante et spécifique. La versatilité des liposomes peut également être exploitée pour ajouter à leur surface diverses molécules, leur conférant des propriétés supplémentaires tels qu'un meilleur ciblage des cellules dendritiques et une faculté accrue à être internalisés.

2.3. Inconvénients des liposomes

Bien qu'étant un excellent outil pour le développement de vaccins, les vaccins liposomiques possèdent plusieurs désavantages qui freinent leur utilisation chez l'Homme et leur évaluation lors d'essais cliniques.

Un défaut, qui a souvent été pointé du doigt, est la faible demi-vie des liposomes dans le plasma et la lymphe. En effet, les liposomes « conventionnels » sont très rapidement opsonisés et reconnus par les cellules du système réticulo-endothélial (Torchilin 2005). Cependant, dans le cas de la vaccination, la phagocytose des liposomes n'est pas un problème étant donné que la cible des vaccins est le système immunitaire. De plus, la plupart des vaccins liposomiques sont injectés par voie sous-cutanée, où le temps de demi-vie des liposomes est plus long (Allen et al. 1993).

Diverses inquiétudes concernant la possibilité d'une production industrielle de grandes quantités de liposomes limitent également leur utilisation en clinique (Saupe et al. 2006). En effet, différentes méthodes de formulation sont déjà employées pour la fabrication de liposomes utilisés dans l'industrie cosmétique, agro-alimentaire ou pharmaceutique mais ces méthodes ont un coût de fabrication élevé et permettent uniquement la manufacture de petits lots de formulations (Laouini et al. 2012). Bien que les méthodes de production industrielle de liposomes doivent encore être améliorées, ces limitations n'ont cependant pas freiné la recherche visant à développer des liposomes thérapeutiques. En effet, plusieurs traitements liposomiques sont déjà sur le marché, montrant la faisabilité d'une industrialisation de ces nanoparticules (cf. ci-dessous).

2.4. Les vaccins liposomiques sur le marché ou en essais cliniques

Les liposomes sont exploités depuis de nombreuses années en thérapie et ont déjà été approuvés pour différents types d'indication : infection fongique (Ambisome®, Amphocil®), contrôle de la douleur (DepoDur™, Exparel®), dégénérescence maculaire liée à l'âge (Visudyne®) et cancers avec des liposomes contenant des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine (Myocet®, Doxil®, Lipodox®) ou la daunorubicin (DaunoXome®) (Fan & Zhang 2013; Bulbake et al. 2017).

Deux vaccins liposomiques sont déjà commercialisés pour le traitement préventif de l'hépatite A (Epaxal®) ou de la grippe (Inflexal V®). Ces liposomes sont utilisés comme vecteurs de virus inactivés adsorbés à leur surface ou de glycoprotéines virales dans ces vaccins. Pour l'instant, aucun vaccin antitumoral à base de liposomes n'a encore été commercialisé, mais plusieurs essais cliniques sont en cours (**Tableau 7**).

Tableau 7. Vaccins liposomiques et peptidiques contre le cancer en essais cliniques.

	Peptide(s) et méthode d'association	Adjuvant(s)	Cancer(s)	Essais cliniques	Références
Stimuvax®	MUC1 (BLP25, peptide lié à une ancre lipidique)	MPLA	CPNPC, cancer du sein, de la prostate, colorectal	Phase I (2) [#] Phase II (8) [#] Phase III (4) [‡]	North & Butts 2005 ; Butts et al. 2011, 2014
-	dHER2 (mélange)	AS15 (liposome, MPLA, QS21, CpG)	Cancer du sein	Phase I (3) [#] Phase II (1) [#]	Hamilton et al. 2012; Limentani et al. 2016
GSK2302025A	recPRAME (mélange)		Mélanome, CPNPC	Phase I (1) [#] Phase II (1) [‡]	(Pujol et al. 2016)
GSK2132231A	recMAGE-A3 (mélange)		Myélome multiple, CPNPC,	Phase I (2) [#] Phase II	Kruit et al. 2013; Pujol et al. 2015;

			mélanome, cancer de la vessie	(2) [#] (1) ^{\$} Phase III (2) ^{\$}	Slingluff et al. 2016; Vansteenkiste et al. 2016; Dreno et al. 2018
Magtri- vacsein	MAG-Tn3 + toxine tétanique (mélange)		Cancer du sein	Phase I (1) [*]	Laubretton et al. 2016
DepoVax®	Survivine (encapsulation)	Liposome, Montanide + peptide helper hétérologue (toxine tétanique)	Cancer de l'ovaire	Phase I (1) [#]	Berinstein et al. 2015
DPX-0907	Multi-peptidique (encapsulation)		Cancer de l'ovaire, du sein, de la prostate	Phase I (1) [#]	Berinstein et al. 2012

Source : Clinicaltrials.gov website; dernier accès le 25 juillet 2018. # étude complète, ‡ étude arrêtée plus tôt en raison de la suspension temporaire du traitement, \$ étude arrêtée pour manque d'efficacité, * étude en cours de recrutement.

Un exemple emblématique de ce type de vaccin antitumoral est le Stimuvax® (liposome BLP25), qui est composé du lipopeptide BLP25 (Tecolomide®) contenant des l'antigène MUC1 associé à un liposome adjuvanté par du MPLA (North & Butts 2005). Ce vaccin a montré de très bons résultats lors d'une étude clinique de phase II chez des patients atteints de carcinome pulmonaire de type CPNPC, avec un taux de survie de 31% sur 3 ans comparé à 17% avec un placebo (Butts et al. 2011). Malheureusement, les trois essais cliniques de phase III qui ont débuté suite à ce succès [START, INSPIRE (CPNPC) et STRIDE (cancer du sein)] ont échoué à atteindre leurs objectifs principaux et secondaires de survie et d'efficacité clinique (Decoster et al. 2012).

Le Stimuvax® fut le premier vaccin liposomique contre le cancer à avoir atteint la phase III d'un essai clinique. Malgré l'interruption de ces essais cliniques, son échec a tout de même permis de mettre en évidence différentes pistes d'amélioration à prendre en compte pour le futur développement de vaccins antitumoraux (choix de(s) antigène(s) et de l'adjuvant) et surtout pour l'élaboration d'essais cliniques, afin de permettre une sélection des patients plus pertinente (monitoring du mutanome et des facteurs immunitaires prédictifs et pronostiques) (Kroemer et al. 2013).

D'autres essais cliniques sont en cours ou dans l'attente d'une poursuite vers une phase III (**Tableau 7**), et de nombreuses études en phase préclinique continuent à exploiter la versatilité des liposomes en tant que vecteur vaccinal contre le cancer (Schwendener 2014; Zamani et al. 2018).

Dans le cadre de ce projet, le liposome ne sera pas uniquement employé en tant que vecteur vaccinal, sa versatilité sera également exploitée afin de développer une plateforme et **une stratégie de conception vaccinale** permettant la sélection et la comparaison d'association d'antigènes et d'adjuvants. L'objectif de ce projet et le cahier des charges des formulations liposomiques développées sont présentés dans le chapitre suivant.

D. Contexte et objectifs de la thèse

1. Résultats préliminaires

Ce chapitre d'introduction montre que les vaccins peptidiques contre le cancer sont des traitements thérapeutiques prometteurs, permettant l'induction d'une réponse immunitaire spécifique et puissante ayant pour conséquence la lyse des cellules tumorales (cf. §C, Introduction). Les composants vaccinaux doivent cependant être sélectionnés de manière avisée pour s'assurer que le système immunitaire reçoive tous les signaux nécessaires à son activation. En effet, il a été établi qu'un vaccin efficace devait contenir trois éléments essentiels (**Figure 19**) :

- un épitope peptidique T CD8+ exprimé par la tumeur, induisant la différenciation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales
- un épitope peptidique T CD4+, déclenchant la différenciation de lymphocytes T CD4+ Helper de type 1
- un adjuvant, permettant d'activer les DC et de stimuler la cross-présentation

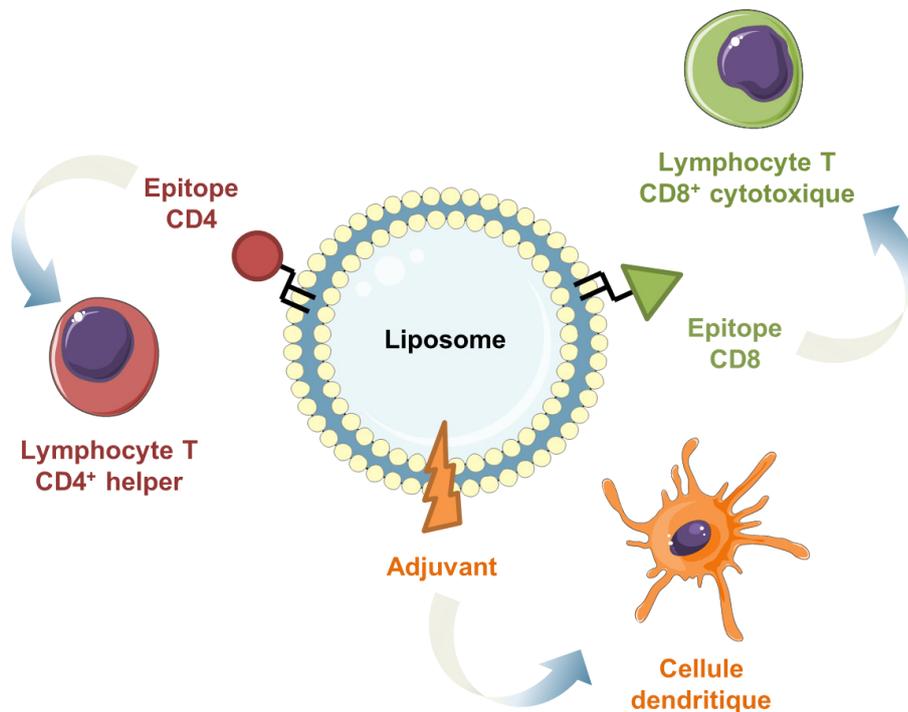


Figure 18. Représentation schématique des constructions liposomiques développées dans l'équipe et des acteurs immunitaires ciblés.

Ce type de vaccin sous-unitaire est d'autant plus efficace lorsque les éléments synthétiques le composant sont adressés directement à la DC. Afin de délivrer simultanément des éléments vaccinaux, ceux-ci peuvent être vectorisés par une même nanoparticule, telle que les liposomes, qui ont été démontrés comme étant des outils de choix dans le développement de vaccins antitumoraux. Au cours de ces dernières années, mon laboratoire d'accueil a développé des vaccins peptidiques à base de liposomes multivalents contenant au minimum ces trois types d'éléments. Ces constructions à base de liposomes contenaient :

- le peptide ErbB2 (épitope CD8), issu de la protéine ErbB2 humaine surexprimée, notamment dans certains cancers du sein
- le peptide HA (épitope universel CD4), issu de l'hémagglutinine A du virus de la grippe
- et le Pam2CAG (adjuvant), un agoniste synthétique du TLR2/6

La capacité de ces vaccins à induire une régression tumorale dans des souris BALB/c portant des tumeurs issues de cellules de carcinomes rénaux, qui expriment la protéine ErbB2 (RenCa-ErbB2), a été évaluée en utilisant différentes localisations tumorales, voies d'administrations ou formes liposomiques (**Figure 20**). Des administrations prophylactiques ou thérapeutiques de liposomes contenant les trois éléments ont été

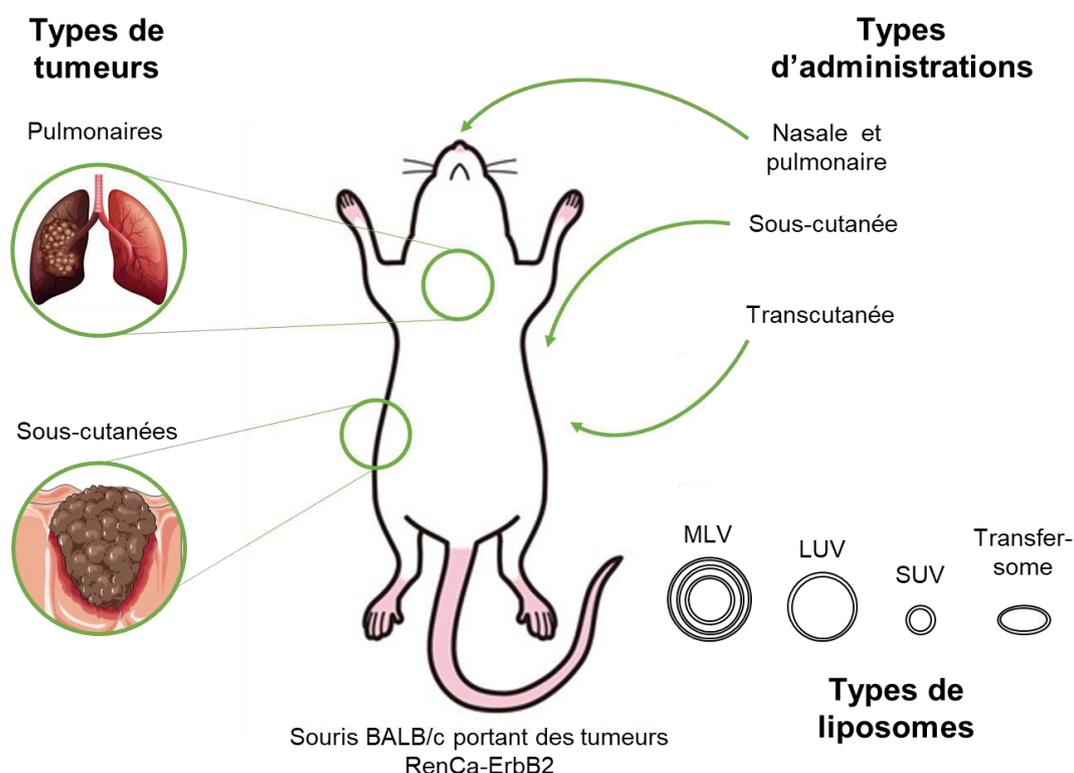


Figure 19. Résumé schématique des différentes voies de vaccination évaluées dans l'équipe.

réalisées par voies sous-cutanée, nasale ou aérienne, et ont toutes démontré leur capacité à inhiber la progression tumorale (Roth et al. 2005; Thomann et al. 2011; Kakhi et al. 2015, 2016). Différentes formes de liposomes (SUV, MLV, LUV), contenant les mêmes composants ont également été comparées et n'ont pas montré de différence d'efficacité. Un autre projet est également en cours pour évaluer l'administration de ces constructions par voie transcutanée (application par massage sur la peau), à l'aide de formes liposomiques déformables appelées transfersomes (Saliba et al. 2017).

2. Objectifs de la thèse

L'avantage de ce type de vaccin (**Figure 19**) est leur extrême versatilité permettant de moduler aussi bien leurs caractéristiques physicochimiques, que leurs composants vaccinaux. Ces constructions multivalentes et modulables auraient pour objectif final d'être utilisées dans le développement de vaccins personnalisés adaptables à chaque tumeur et au système immunitaire de chaque patient.

Ainsi, il a été proposé de démontrer la versatilité de nos constructions vaccinales et leur potentiel personnalisable, en les modulant pour qu'elles soient efficaces contre un autre modèle tumoral. Dans l'optique d'évaluer les vaccins dans un modèle pré-clinique plus proche de l'Homme, nous avons réalisé cette étude avec un modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires transformées par le papillomavirus humain : les cellules TC-1 injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6J (Lin et al. 1996; Prabhu et al. 2012; Fan et al. 2015).

Le **Tableau 8** résume le cahier des charges que nous nous sommes fixé pour la formulation des constructions vaccinales. Ces critères ont été choisis d'après la littérature résumée dans les chapitres antérieurs (cf. §**A**, **B** et **C**, Introduction) ainsi que les résultats antérieurs obtenus au laboratoire (Roth et al. 2005; Thomann et al. 2011; Kakhi et al. 2016). Lors de chaque étape de ce projet, nous nous sommes assurés que chaque formulation liposomique était conforme à ce cahier des charges avant leur évaluation *in vivo*.

Tableau 8. Cahier des charges.

Fonctions	Critères	Niveaux (flexibilité)
Favoriser le ciblage et l' internalisation des liposomes par les DC	Diamètre moyen des liposomes	20 < Taille < 100 (\pm 10 nm)
	Potentiel zêta (charge de surface)	Potentiel zêta négatif < 0 mV
Vectorisation d'épitopes peptidiques	Conjugaison à la surface de peptide(s) par liaison covalente à une ancre maléimide	> 75% de taux de couplage peptidique
	Présence de cystéine dans la séquence peptidique	Pas de perturbation de l'antigénicité du peptide lors de l'ajout d'une cystéine (<i>si non présente</i>)
Activation et maturation des DC	Agonistes des TLR et/ou des NLR incorporés dans la membrane des liposomes	Pas de perte d'intégrité des nanoparticules (agrégation) ou de variation de taille
Maintien de propriétés physicochimiques uniformes (pour que seule la variation de composition affecte l'efficacité de la formulation)	Suspension de SUV homogène	PDI < 0.3
	Méthode de formulation reproductible	Peu de variation de la taille (\pm 30 nm), du potentiel zêta (\pm 10 mV) et du taux de couplage peptidique entre plusieurs lots de formulation
	Stabilité lors de la congélation (conservation)	

Pour concevoir de nouveaux vaccins thérapeutiques, j'ai développé une méthode de sélection des trois composants vaccinaux qui exploite le liposome comme une plateforme où chaque élément est ajouté de manière séquentielle dans le vaccin et son immunogénicité est évaluée dans des souris saines. Deux épitopes CD4 universels, deux épitopes CD8 et trois agonistes des TLR ou des NLR (adjuvants) ont ainsi été comparés, permettant le développement de trois vaccins liposomiques efficaces contre ce nouveau modèle tumoral. Les différentes étapes de criblage, ayant permis la sélection des éléments vaccinaux, sont décrites dans le **Chapitre 1**.

Ces trois vaccins ont ensuite été comparés dans des souris portant des tumeurs pulmonaires, afin de déterminer i) leur capacité à diminuer ou inhiber la croissance tumorale et à induire une réponse immunitaire spécifique, ii) leur limite temporelle

d'efficacité en augmentant le délai entre l'injection des cellules tumorales et l'injection du vaccin et iii) les acteurs immunitaires à l'origine de leur efficacité (cellules T CD4⁺ / T CD8⁺ et sous-populations de DC impliquées). En effet, la surveillance et la compréhension des mécanismes immunitaires mis en œuvre lors d'une vaccination thérapeutique sont des éléments clés qui doivent être pris en compte dans le développement de traitements contre le cancer (Keilholz et al. 2006; Butterfield 2015). L'étude comparative de nos traitements et le décryptage de leurs mécanismes immunitaires sont présentés dans le **Chapitre 2**.

La dernière étape du projet consistait à repousser les limites thérapeutiques de nos constructions en combinant plusieurs adjuvants à l'intérieur d'une même nanoparticule, afin d'augmenter l'immunogénicité de nos vaccins. Lors de cette partie, deux associations d'agonistes des TLR et NLR ont été comparées, en évaluant leur capacité à induire une synergie d'activation du système immunitaire. Des résultats préliminaires ont été obtenus et sont résumés dans le **Chapitre 3**.

3. Publications et communications

Ces travaux de thèse ont fait l'objet d'un abstract publié, une publication soumise et une publication en cours de soumission. De plus, plusieurs communications orales ou par affiches ont été réalisées au cours de ces quatre années de thèse et ont été récompensées par différents prix.

❖ Abstract

- Célia Jacobberger-Foissac, Hanadi Saliba, Cendrine Seguin, Anaïs Brion, Benoît Frisch, Sylvie Fournel*, Béatrice Heurtault*. Development of a novel immunotherapy with Toll-like and Nod-like receptors synergy for targeted cancer therapy. Immunother Cancer. (2017). Abstracts from the 4th ImmunoTherapy of Cancer Conference, Prague, Czech Republic. 20–22 March 2017. **Publié**.

❖ Publications

- Célia Jacobberger-Foissac, Hanadi Saliba, Cendrine Seguin, Anaïs Brion, Zahra Kakhi, Benoît Frisch, Sylvie Fournel*, Béatrice Heurtault*. Harnessing the versatility of a liposomal platform for the design of multivalent peptide-based cancer vaccines. *Eur J Pharm Biopharm* (2018). **Soumis**.
- Célia Jacobberger-Foissac, Cendrine Seguin, May Wantz, Hanadi Saliba, Vincent Flacher, Benoît Frisch, Béatrice Heurtault*, Sylvie Fournel*. Peptide-based vaccine containing monophosphoryl lipid A as adjuvant induced a strong and persistent antitumor immune response in a HPV-transformed tumor model. *Oncoimmunology* (2018). **En cours de rédaction**.

❖ Communications par affiches

- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Development of a novel immunotherapy with Toll-like and Nod-like receptors synergy for targeted cancer therapy. **1st Annual Meeting of the Upper Rhine Immunology Group** – 1 Déc 2017 – IGBMC, Illkirch-Graffenstaden, France.
- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Development of a novel immunotherapy with Toll-like and Nod-like receptors synergy for targeted cancer therapy. **4th Immunotherapy of Cancer Conference (ITOC4)** – 20-22 Mar 2017 – Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic. (Premier prix de poster).
- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Development and evaluation of liposomal constructs for targeted cancer therapy. **Forum Biochem 2016 Rencontres académie & industries** – 2-3 Juin 2016 – ESBS, Pôle API, Illkirch-Graffenstaden, France. (Prix du public pour le meilleur poster).
- Célia Jacobberger-Foissac. *Poster vulgarisé* Immunothérapie : réveillez le tueur qui est vous ! **“Les Doctoriales 2016”** – 17-21 Mai 2016 – Château du Liebfrauenberg, Goersdorf, France.
- Célia Jacobberger-Foissac. Liposome-based vaccines for targeted cancer therapy. **Doctoral school day 2015** – 14-15 Mar 2016 – Collège Doctoral Européen, Strasbourg, France.

❖ Communications orales

- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Development of a novel immunotherapy with TLR/NLR synergy for targeted cancer therapy. **2nd World Immunotherapy Council Young Investigator during SITC's 32nd Annual Meeting** – 6-12 Nov 2017 – National Harbour, MD, USA. (“International scholar”, conférence invitée).
- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Development of a novel immunotherapy with TLR/NLR synergy for targeted cancer therapy. **Immuno'16 – First Immunology Meeting in Strasbourg** – 4 Oct 2016 – Collège Doctoral Européen, Strasbourg, France.
- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Conception de vaccins liposomiques pour une thérapie ciblée contre le cancer. **Les Journées du Campus d'Illkirch 2016** – 21-22 Avr 2016 – ESBS, Pôle API, Illkirch-Graffenstaden, France. (Prix du jury de la meilleure présentation orale).
- Célia Jacobberger-Foissac *et al.* Liposome-based vaccines for targeted cancer therapy. **French-American Doctoral Exchange program: nanoparticles for medicine** – 20-23 Mar 2016 – Clnatec/CEA Leti, Grenoble, France. (10 étudiants français sélectionnés parmi 40 candidats).

CHAPITRE 1

**Utilisation d'une plateforme liposomique
pour la conception de vaccins peptidiques
contre le cancer**

L'**imagination** est plus importante que le **savoir**.

Albert Einstein

A. Résumé de l'étude

1. Objectifs

Ces 20 dernières années, de nouvelles technologies ont vu le jour permettant une meilleure compréhension de la réponse immunitaire antitumorale et l'identification des éléments minimaux nécessaires à son activation. Ces découvertes ont entraîné l'émergence d'une nouvelle stratégie thérapeutique : la vaccination sous-unitaire composée de peptides tumoraux et d'adjuvants. Malgré un très fort engouement, cette approche a pour le moment essuyé de nombreux échecs chez l'Homme, soulignant l'importance d'une conception vaccinale rationnelle et méthodique (De Gregorio & Rappuoli 2014).

Dans ce contexte, il a été proposé d'utiliser les nanoparticules en tant que vecteur pour le développement de vaccins peptidiques contre le cancer. Afin de valider cette approche au cours de ma thèse, nous avons mis au point une stratégie simple de sélection des composants vaccinaux qui emploie des vecteurs liposomiques précédemment développés au laboratoire (Roth et al. 2005; Thomann et al. 2011; Kakhi et al. 2016). La versatilité des liposomes a été exploitée pour développer une plateforme personnalisable de conception de vaccins.

L'objectif de cette étude était de concevoir un vaccin liposomique contenant les trois types d'éléments essentiels à l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale : i) un épitope universel CD4, ii) un épitope CD8 spécifique de la tumeur et iii) un adjuvant moderne, agoniste des TLR ou NLR. Ce vaccin devait être efficace contre un modèle de tumeurs pulmonaires orthotopiques, transformées par le papillomavirus humain (HPV) : la lignée cellulaire murine TC-1. Contrairement au modèle ectopique précédemment utilisé au laboratoire (cf. §D.1, Introduction) la lignée tumorale TC-1 a été décrite comme étant un très bon modèle préclinique de tumeurs humaines induites par HPV, telles que les cancers du poumon de type CPNPC ou le cancer du col de l'utérus (van der Burg & Melief 2011; Prabhu et al. 2012; Fan et al. 2015).

2. Résultats

Lors de cette étude, les éléments vaccinaux ont été sélectionnés en les ajoutant de manière séquentielle aux nanoparticules liposomiques et en évaluant leur capacité à induire une réponse immunitaire spécifique dans des souris immunisées ne portant pas de tumeur. Chaque formulation vaccinale réalisée (contenant un, deux ou les trois types d'éléments) a été caractérisée pour vérifier l'uniformité physicochimique des suspensions liposomiques en terme de taille, de potentiel zêta et de monodispersité.

Suite à des phases successives de criblage, plusieurs épitopes peptidiques ont été comparés, permettant la sélection d'une combinaison optimale de deux épitopes peptidiques : le peptide CD4 universel HA, issu de l'hémagglutinine A du virus de la grippe et le peptide E7C issu d'une protéine d'HPV exprimée par la lignée tumorale TC-1. L'association de ces deux épitopes à des liposomes contenant un agoniste du TLR2/6, du TLR4 ou de NOD1 ont toutes permis l'induction d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre le peptide tumoral E7C. Le potentiel vaccinal de ces trois formulations a permis de réduire significativement le nombre de nodules pulmonaires se développant dans les poumons après une injection i.v. des cellules TC-1.

3. Conclusions

Ainsi, grâce à la mise en place d'une stratégie de conception vaccinale, j'ai développé trois formulations liposomiques ayant toutes un fort potentiel vaccinal et présentant une efficacité antitumorale de même amplitude contre un modèle pulmonaire orthotopique (à ce stade du projet). Ces résultats confirment l'importante versatilité des liposomes en tant que vecteurs, et leur utilité comme plateforme de développement vaccinal, permettant la sélection de composants synthétiques minimaux et l'évaluation d'associations d'épitopes-adjuvant. Les trois formulations développées dans ce chapitre étaient composées d'agonistes agissant par des voies de signalisations différentes. Il serait donc intéressant d'étudier le mode d'action de ces vaccins pour identifier les acteurs cellulaires impliqués dans leur effet et identifier des caractéristiques immunitaires communes, requises pour leur efficacité.

B. Article #1

“Harnessing the versatility of a liposomal platform for the design of multivalent peptide-based cancer vaccines”

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **soumis**.

Note : *Pour faciliter la lecture, les figures et les légendes de l'article ont été placées directement dans le texte.*

Harnessing the versatility of a liposomal platform for the design of multivalent peptide-based cancer vaccines

Célia Jacobberger-Foissac^a, Hanadi Saliba^{a1}, Cendrine Seguin^a, Anaïs Brion^a, Zahra Kakhi^a, Benoît Frisch^a, Sylvie Fournel^{*a}✉, Béatrice Heurtault^{*a}✉

^a Université de Strasbourg, CNRS, 3Bio team, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France

¹ Lebanese University, Laboratory of Immunology, Faculty of Public Health, Campus Pierre Gemayel, Fanar, Lebanon

* Equal contribution

✉ Corresponding authors: Béatrice Heurtault, bheurtault@unistra.fr and Sylvie Fournel, s.fournel@unistra.fr.

Keywords

Liposome; Therapeutic vaccination; Cancer; Adjuvant; TLR agonist; NLR agonist; Peptide-based vaccine.

Abbreviations

ACK, ammonium-chloride-potassium buffer; Ag, agonist; C12iEDAP, acylated derivative of the dipeptide gamma-d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid; CD8 epitope, CD8⁺ T-cell epitopes; CD4 epitope, CD4⁺ T-cell epitopes; Chol, cholesterol; CTL, cytotoxic T-lymphocytes; DC, dendritic cells; DLN, draining lymph node, DPGmal, 19-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecane-1,2-diyl dipalmitate; FCS, fetal calf serum; HA, hemagglutinin A; HPV, human papillomavirus; i.v., intravenous; KLH, keyhole limpet hemocyanin; Lp, liposome; MLV, multilamellar vesicle; MPLA, monophosphoryl lipid A; NLR, NOD-like receptor; NSCLC, non-small-cell lung cancer; Pam₂CAG, S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-alanyl-glycine; PRR, pattern-recognition receptor; PC, L- α -phosphatidylcholine; PDI, polydispersity index; PG: L- α -phosphatidyl-DL-glycerol; RenCa, renal carcinoma; s.c., subcutaneous; SUV, small unilamellar vesicle; TAA, tumor-associated antigen; Th, T helper cell; TLR, toll-like receptor; TT:, tetanus toxin.

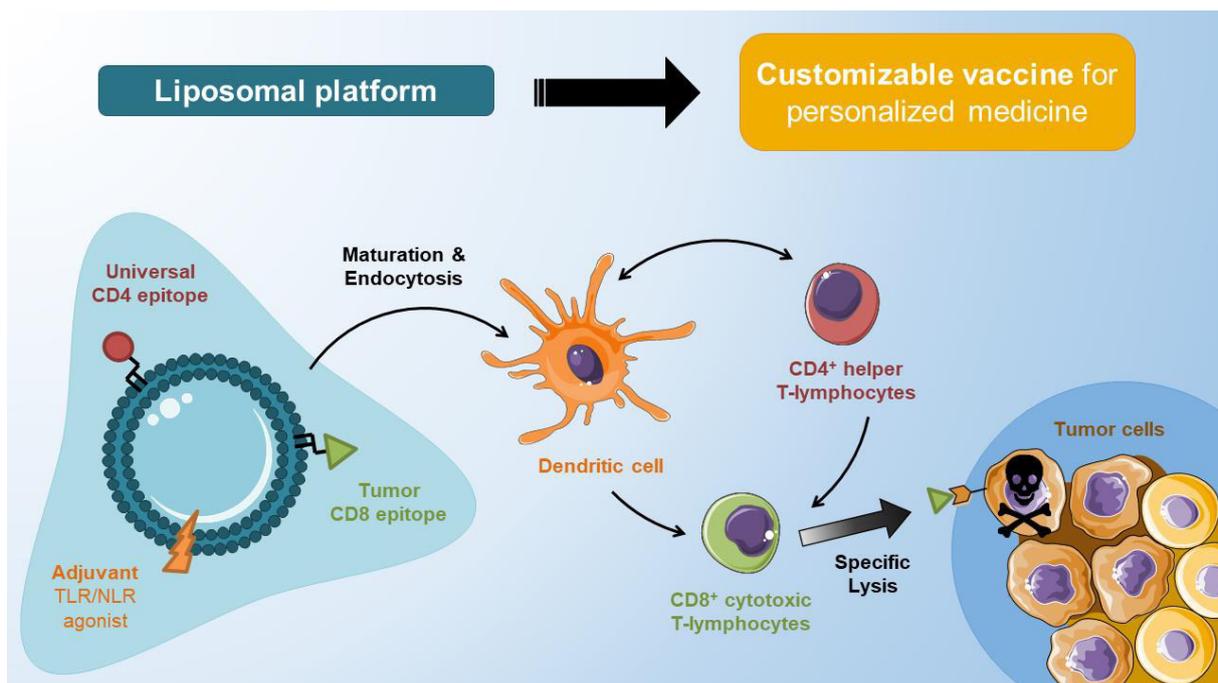
Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

Abstract

Therapeutic cancer vaccines need thoughtful design to efficiently deliver appropriate antigens and adjuvants to the immune system. In the current study, a liposomal platform was developed to conceive vaccines containing the three elements needed for the induction of efficient antitumor immunity: i) a CD4 epitope peptide able to activate CD4⁺ T helper cells ii) a CD8 tumor-specific epitope peptide recognized by CD8⁺ T cytotoxic cells and iii) Pattern Recognition Receptor (PRR) agonists which act as adjuvants for the activation of innate immunity. To design fully personalized cancer vaccines, we customized each type of elements by tethering them individually to liposomes for comparison in an easy screen on tumor-free mice. As proof of concept, we succeeded in developing liposomal constructs bearing a peptide from HA influenza virus protein as CD4 epitope, a peptide from HPV16 E7 oncoprotein as CD8 epitope and TLR4, TLR2/6 or NOD1 agonists as adjuvant, which were efficient in a mouse model of disseminated tumors transformed by HPV16 (pulmonary TC-1 cells expressing E7). Our results confirmed the versatility of this liposomal platform as efficient delivery system for cancer vaccination and powerful tool for the design of vaccines, the selection of personalized components, and the evaluation of epitope-adjuvant association.

Graphical abstract



Introduction

Since the discovery of the first human tumor-associated antigen (TAA) in 1991 [1], an increasing interest towards active immunotherapy has grown, offering new hope for the design of effective therapeutic vaccines [2,3]. Activation of adaptive immune responses represent a potent alternative for the two major challenges in cancer therapy: increasing specificity to avoid side effects and inducing immune memory for the prevention of tumor relapse.

One major key steps for antitumor immunity induction is the differentiation of CD8⁺ T-cells into cytotoxic T-lymphocytes (CTL), which perform selective destruction of tumor cells [4]. Physiologically, a cellular immune response begins with the endocytosis of tumor cell fragments by dendritic cells (DC) and the subsequent antigen processing of TAA-derived peptides (refer as epitopes). Those peptides, presented at the DC surface associated to MHC molecules, will prime CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and induce their differentiation into type 1 T helper lymphocytes (Th) and CTL respectively. Th1 cells producing IFN- γ are crucial for priming and expansion of tumor-specific CTL and promote the generation and maintenance of CD8⁺ memory T-cells [5,6]. The efficiency of this process is also dependent upon the maturation of DC, which should have perceived danger signals from the tumor micro-environment through its pattern-recognition receptors (PRR). To summarize, three types of cells, CTL, Th cells and DC, are involved in antitumor immune response and should be therefore targeted by therapeutic vaccines.

Several studies established the importance of Th cells for the development of effective cancer vaccines [7–11]. Interestingly, some of them showed that the addition of CD4⁺ T-cell epitope peptides (CD4 epitope) derived from antigen that are not expressed by the tumor, in association to tumor specific CD8⁺ T-cell epitope peptides (CD8 epitope), increased specific antitumor activity [12–14]. DC maturation and thus, selection of potent danger signals (also known as adjuvants in vaccination) are also essential for the induction of short peptides immunogenicity. An optimal adjuvant should i) promote inflammation and recruit DC, ii) activate those cells to promote antigen uptake and epitope presentation and iii) induce the expression of co-stimulatory molecules and cytokines for T-cell activation, proliferation and polarization of cellular immune response [15,16]. Within the last decades, agonists of PRR from TLR and NLR families appeared to be the most promising candidates to fulfill these criteria, and are now commonly used to enhance subunit vaccines immunogenicity [17,18]. For example, the monophosphoryl lipid-A (MPLA), a TLR4 ligand,

has received FDA approval and is already involved in several clinical trials [19]. In conclusion, efficient cancer vaccines should induce potent CTL-responses against tumor cells as well as Th differentiation and DC maturation [20,21]. Synthetic and molecularly defined vaccine should therefore contain three elements: a tumor-derived peptide (CD8 epitope) to ensure tumor specificity, a CD4 epitope to activate Th cells and a PRR agonist as adjuvant.

It was already shown that peptides and TLR agonists should be presented simultaneously to DC in order to induce an optimal immune response, for instance, by using a nanoparticulate carrier such as liposomes [22]. Because of their numerous advantages, interest for liposome-based delivery system dramatically increased over the past decades in the vaccine development area [23,24]. Indeed, conventional liposomes are intrinsically biocompatible and present a very low pro-inflammatory activity and cytotoxicity. Their chemical and physical characteristics (size, surface, composition,...) can be easily modulated to enhance DC targeting and antigen uptake. And finally, their inherent properties concede them the capacity to incorporate a wide range of molecules, allowing the association of hydrophilic peptides and amphiphilic adjuvants to the same nanoparticle. In our previous works, liposomal vectors were used to co-deliver peptide epitopes in combination with adjuvant for different vaccinal applications [25–28]. We developed a cancer vaccine against renal carcinoma (RenCa) tumor cells, expressing ErbB2 in BALB/c mice. The liposomal construct contained an ErbB2-derived CD8 epitope and an influenza-derived CD4 epitope in association with S-[2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]-R-cysteinyl-alanyl-glycine (Pam₂CAG, TLR2/6 agonist). We showed that prophylactic and therapeutic vaccination with this construct induced a strong antitumor activity against RenCa cells and complete tumor eradication in several mice [27].

To go further in the development of liposome based-antitumor vaccines, we took advantage of the versatility of our liposomal platform to design fully personalized peptide-based cancer vaccines, by customizing each type of elements associated to the nanoparticles. In this study, as a proof of concept, we developed a rational and sequential strategy using an *in vivo* easy screen in tumor-free mice for the design of peptide-based liposomal constructs that induce an optimal effective immune response in mouse bearing tumors transformed by human papillomavirus (HPV). For this, in a first step, we compared immune response induced by two universal CD4 peptide epitopes: an influenza-derived CD4 peptide already used in our first works and a CD4 peptide epitope derived from tetanus toxin. To note, these peptides are designed for human use, as most human population is immunized against flu and tetanus. In a second step, we chose CD8 peptide

epitopes that confer the tumor specificity of our construct. These peptides were derived from E7, a TAA expressed by our tumor model (the HPV-transformed TC-1 cell line) [29]. In the last step, various adjuvants were compared (TLR2/6, TLR4 and NOD1 agonists) in association with the epitope combination selected before. Our strategy led to the development of three effective cancer vaccines against a mouse model of HPV-transformed tumors.

Materials and Methods

1. Formulation and characterization of liposomal constructs

1.1. Lipids and adjuvants

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC), and cholesterol (Chol, recrystallized in methanol) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Egg yolk L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (PG) was purchased from Avanti Polar lipids (Alabaster, AL). Lipid purities exceeded 99%. The lipopeptide S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-(R)-cysteiny-alanyl-glycine (Pam₂CAG) and the thiol-reactive dipalmitoylglycerol-maleimide anchor (DPGmal) were synthesized in the laboratory as previously described [26,30]. The lipopolysaccharide derivative monophosphoryl lipid A (MPLA) and the acylated derivative of the dipeptide γ -D-Glu-mDAP (C12iEDAP) were purchased from Invivogen (San Diego, CA). All reagents were conserved under argon atmosphere at -20 °C, in a powder form or dissolved in chloroform/methanol (9/1 v/v).

1.2. Synthetic peptides and peptides conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH)

Synthetic peptides were obtained from Genosphere Biotechnologies (Paris, France). The tetanus toxin-derived peptide TT 830-844 (CG-QYIKANSKFIGITEL, MW=1885 g/mol) and influenza virus haemagglutinin-derived peptide HA 307–319 (PKYVKQNTLKLAT-C, MW=1606 g/mol), refer to CD4⁺ T-cell peptide epitopes. Peptides derived from the *Human papillomavirus* oncogene protein E7 49-57 (E7C: RAHYNIVTF-C and CE7: C-RAHYNIVTF, MW=1223 g/mol), refer to CD8⁺ T-cell peptide epitopes. MART 27-35 peptide (AAGIGILTV, MW=815 g/mol) is an irrelevant peptide in this tumor model and was used as negative control during ELISpot assay. HA or TT peptides conjugated to KLH (PKYVKQNTLKLATC-KLH, KLH-CGQYIKANSKFIGITEL) were purchased from Genosphere Biotechnologies. Imject Alum® was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

1.3. Formulation of peptide-based liposomes

Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by lipid film hydration technique as described previously [31]. Briefly, a chloroform/methanol solution (9/1 v/v) containing a mixture of

lipids, adjuvant and/or DPGmal anchor were mixed in a round-bottom Pyrex tube, and was completely dried under high vacuum for 45 min. Molar ratios of each component are shown in **Table 1**. The resulting lipid film was then hydrated in 10 mM Hepes buffer (pH 6.5) containing 5% (w/v) sorbitol at a final phospholipid concentration of 15 mM, leading to the formation of MLV. This suspension was then sonicated (1 s cycle every 3 s) during 1 h at room temperature under a continuous flow of argon, using a Vibra Cell 75041 ultrasonicator (750 W, 20 kHz, Fisher Bioblock Scientific) equipped with a 3 mm-diameter tip probe (40% amplitude). The resulting small unilamellar vesicle (SUV) preparations were centrifuged at 13,000g for 15 min to remove the titanium dust originating from sonication probes.

Table 1. Composition of formulated liposomes

Liposomal constructs	Composition		Molar proportion	
	Bilayer	Peptide(s)	Bilayer	Peptide(s)
Plain lp.	PC/PG/Chol		54/13/33	
Lp. HA-Pam ₂ CAG	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	HA	50.9/13/33/3/0.1	0.75
Lp. TT-Pam ₂ CAG	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	TT	50.9/13/33/3/0.1	
Lp. HA-E7C-Pam ₂ CAG	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	HA/E7C	50.9/13/33/3/0.1	
Lp. HA-CE7-Pam ₂ CAG	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	HA/CE7	50.9/13/33/3/0.1	0.75/0.75
Lp. HA-E7C-MPLA	PC/PG/Chol/DPGmal/ MPLA	HA/E7C	51/13/33/3/ 0.007	
			51/13/33/3/ 0.0007	
Lp. HA-E7C-C12iEDAP	PC/PG/Chol/DPGmal/ C12iEDAP	HA/E7C	48.7/13/33/3/ 2.3	0.23
			50.77/13/33/3/ 0.23	

PC: phosphatidylcholine, PG: phosphatidylglycerol, Chol: cholesterol, DPGmal: dipalmitoyl glycerol-maleimide, Pam₂CAG: dipalmitoyl-cysteine-alanyl-glycine, MPLA: monophosphoryl lipid-A, C12iEDAP: acylated derivative of the dipeptide γ -D-Glu-mDAP. Bold is used to designate the element which have a different molar ratio but the same lipid composition.

1.4. Peptide conjugation to liposomes

Peptides were first dissolved in milliQ water and potential disulphide bonds were reduced with 0.7 M eq. tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (Sigma-Aldrich) for 15 min

under argon. Equimolar quantities of CD4 and/or CD8 peptide epitopes were then coupled to preformed DPGmal-containing SUV by Michael addition at pH 6.5 (0.5 molar eq. of each peptide compared to surface accessible thiol-reactive maleimide functions). After 4h under argon at room temperature, a 10-fold excess of β -mercaptoethanol was added for 30 min to inactivate all unreacted maleimide groups on internal and external surface of SUV. Then, the formulation was extensively dialyzed (Spectra/Por, exclusion limit of 12–14 kDa, Spectrum laboratories, DG Breda, Netherlands) against a 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 5% (w/v) sorbitol to eliminate unconjugated peptides and excess of reagents. Finally, 4% glucose (w/v) was added as a cryoprotectant and formulations were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further usage.

1.5. Physicochemical characterization of liposomal constructs

1.5.1. Nanoparticle diameter measurement

The average diameter of formulated liposomes was measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern instruments, Orsay, France) with the following specifications: viscosity: 1.014 cP; refractive index: 1.34; scattering angle: 90°; temperature: 25 °C. SUV were diluted at 1/100 in 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 5% (w/v) sorbitol, and the results presented are the average of three consecutive measurements. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument. Particle size is expressed in intensity. Sample are considered monodispersed when the polydispersity index (PDI) is < 0.3.

1.5.2. Zeta potential

Zeta potential of liposomes was determined at 25 °C using a Zetasizer Nano-ZS. The samples were dispersed at 1/100 in 10 mM Hepes buffer containing 5% (w/v) sorbitol (pH 7.4) and the zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation.

1.5.3. Phosphatidylcholine assay

The PC content of formulated liposomes was determined using an enzymatic assay with the LabAssay™ Phospholipid kit (Wako Pure Chemical industries Ltd, Richmond, VA). Briefly, 1-2 μ L of SUV were incubated with 200 μ L of the enzymatic reagent in triplicates in a 96-well plate. The reagent contains phospholipase C that releases the choline, which

is then oxidized by the choline oxidase. The reaction produces hydrogen peroxide needed by the peroxidase to convert a chromogen into a blue product. After 10 min at 37 °C, absorbance was measured at $\lambda=595$ nm using a microplate reader (Safas SP2000, Xenius 5801, Monaco). PC content in each sample was determined from a calibration curve prepared with purified choline chloride.

1.5.4. Peptide assay

The quantification of conjugated peptides in each formulation was performed using fluorescamine (4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dione, Sigma-Aldrich) in a fluorometric assay. Briefly, amino acids were generated during acid hydrolysis of peptide-conjugated liposomes at 110 °C for 12 h in a heating module (Pierce Reacti Therm III™, Thermo Fisher scientific). After neutralization by the addition of sodium hydroxide, 20 μ L of the hydrolysis solution was added to 750 μ L of 50 mM sodium borate buffer (pH 9), followed by the addition of 250 μ L of fluorescamine solution in dioxane (300 mg/L). Fluorescence was measured immediately at $\lambda_{\text{excitation}} = 400$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 480$ nm. A physical mixture of plain liposomes and peptides were used to establish a calibration curve. Coupling rates were calculated relative to the quantity of surface-exposed maleimide functions.

2. *In vivo* evaluation of liposomal constructs

2.1. Animals

Specific-pathogen-free 6-8 week old male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). *In vivo* experiments were performed in full compliance with the EU directive 2010/63/EU adopted on 22 September 2010, relating to the protection of animals used for experimental purposes and in compliance with the French law (décret n° 2013–118, 1 February 2013). Experiments were performed with the approval of the local Animal Care and Use Committee of Alsace (authorization number: APAFIS #10825- 2017073117337272 v2).

2.2. Tumor cell line

All the reagents use for cell culture was purchased from Sigma-Aldrich. TC-1 cells expressing HPV16 E7 protein were obtained from ATCC® (CRL-2785™, Manassas, VA). TC-1 cell line was derived from pulmonary epithelial cells of C57BL/6J mice, immortalized

by transduction of the LXS_N16E6E7 retroviral vector and subsequently transformed with the pVEJB plasmid expressing activated human c-Ha-*ras* gene [29]. They were cultivated in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and were incubated at 37 °C in 5% CO₂, 80% humidity.

2.3. Injection schedules

2.3.1. Immunization protocols

To study the antigenicity of CD4 epitopes, mice were immunized once with a subcutaneous injection (100 µL) of 15 µg of peptides tethered to adjuvanted liposomes or conjugated to KLH and emulsified in alum. Control groups were injected with equivalent amount of lipids (0.72 mg PC for plain liposomes) or alum (2 mg aluminium oxide for alum control). The mice were sacrificed 10 days after injection (**Figure 1A**). For the comparison and choice of CD8⁺ T-cell epitopes, mice were immunized twice with liposomes containing 15 µg of E7 peptide or plain liposomes at day 0 and 14 and sacrificed 7 days after the last

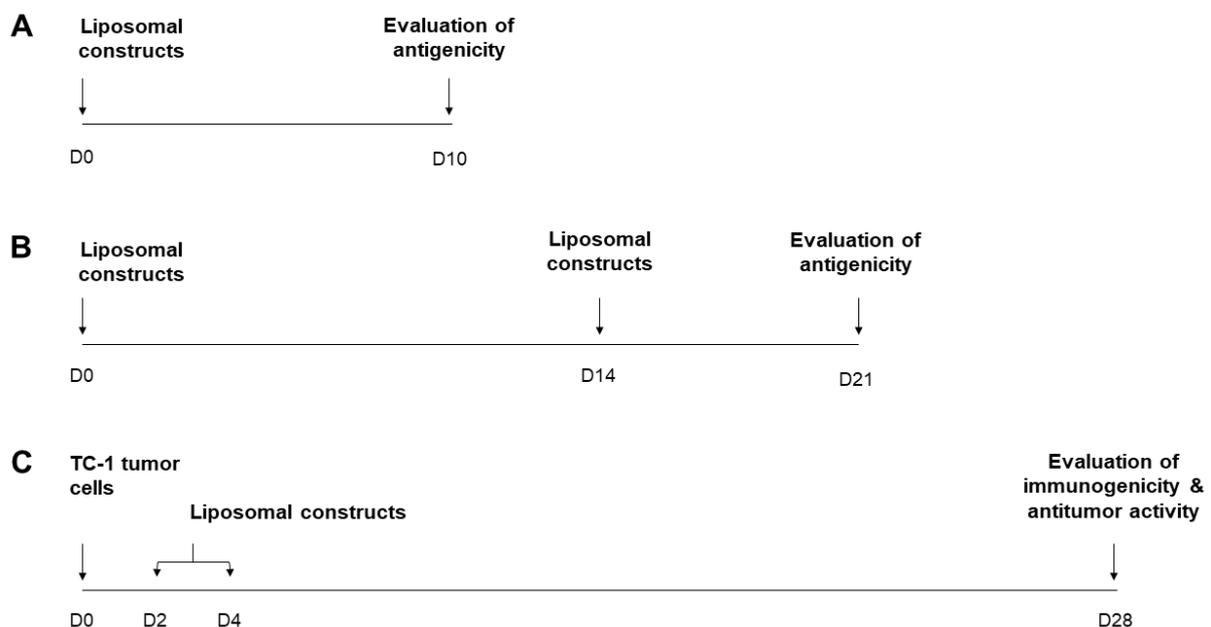


Figure 1. Immunization and vaccination protocols.

(A) Protocol for the evaluation of CD4 epitopes antigenicity. The immune response was evaluated 10 days after a single immunization. (B) Protocol for the assessment of CD8 epitope antigenicity. Mice received two vaccine injections (s.c.) and the immune response was evaluated 7 days after the last immunization. (C) Protocol for the study of therapeutic vaccine activity. Mice received two injections of liposomal constructs on days 2 and 4 after i.v. implantation of TC-1 cells. 28 days after the beginning of the experiment, immunogenicity and antitumor efficacy was assessed.

immunization (**Figure 1B**). In both protocols, spleen and lymph nodes draining the injection site were harvested to assess the induction of a specific immune response.

2.3.2. Therapeutic vaccination protocol

Antitumor efficacy of vaccine candidates was studied in a murine model of therapeutic vaccination (**Figure 1C**). 100,000 TC-1 cells were injected intravenously in the tail vein of C57BL/6J mice on day 0, followed by two s.c. injections of liposomal vaccines (15 µg E7 peptide content) at day 2 and day 4. 28 days after tumor cell injection, lymphoid organs were harvested, and lungs were collected to evaluate the antitumor activity.

2.4. Evaluation of immune response

2.4.1. Lymph node and spleen cell preparation

Spleen and lymph nodes draining the injection site (axillary and inguinal) were harvested and conserved in ice-cold RPMI 1640 culture medium, supplemented with 100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% FCS and 10 µM β-mercaptoethanol. Spleens and lymph nodes from the same treatment group were pooled. Organs were dissociated and filtered onto a 70-µm nylon mesh cell strainer (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Resulting cell suspensions were centrifuged at 200g for 5 min. The lymph node cell pellet was resuspended in RPMI medium, where FCS is replaced with 2% normal mouse serum (Dominique Dutscher, Brumath, France). To lyse red blood cells, the spleen cell pellet was resuspended in ammonium-chloride-potassium (ACK) lysing buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and incubated at room temperature for 30 sec. ACK was diluted 10 times in RPMI to stop the lysis. After centrifugation, spleen cell pellet was resuspended in RPMI 2% normal mouse serum. Cells were incubated at 4.10⁶ cells/mL in a PVDF membrane 96-well plate pre-coated with IFN-γ purified antibody for ELISpot (see below).

2.4.2. IFN-γ ELISpot

Direct procedure was used in tumor-bearing mice and indirect procedure with sample originated from tumor-free mice.

2.4.2.1. Direct procedure

PVDF membrane 96-well plates (Multiscreen® HTS filter plates, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were activated with 35% ethanol for 1 min, followed by three washes with sterile PBS. All plates were coated with 100 µL/well of purified anti-mouse IFN-γ (clone AN-18, Thermo Fisher Scientific) at 15 µg/mL in PBS overnight at 4 °C. After three washes, membranes were blocked with RPMI 10% FCS for at least 2 h at 37 °C and washed again with RPMI without FCS. Spleen or lymph node cell suspensions were cultured in triplicates ($4 \cdot 10^6$ cells/mL), in presence of recombinant human IL-2 (30 UI/mL), with CD4⁺ or CD8⁺ T-cell epitopes (10 µg/mL), irrelevant peptide (10 µg/mL) or TC-1 tumor cells ($1.25 \cdot 10^5$ cells/mL). Cells cultured in medium alone or with 1.25 µg/mL of concanavalin-A (Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls, respectively. After 20-24 hrs at 37 °C, 5% CO₂, cells were removed by 6 washes with washing buffer. A volume of 100 µL of biotinylated anti-IFN-γ antibody (clone R4-6A2, Thermo Fisher Scientific) diluted at 1 µg/mL in PBS 0.01% Tween 20 was added for 2 h at 37 °C. Plates were then washed 6 times with washing buffer and alkaline phosphatase-conjugated extravidin (Sigma-Aldrich, 1/5000) was added. After 45 of incubation at 37 °C, followed by 3 washes in washing buffer and 3 washes in PBS alone, spots were revealed by the addition of 100 µL of BCIP/NBT substrate (Sigma-Aldrich) during 20 min. To stop the reaction, plates were extensively washed with water and dried overnight before analysis (Bioreader 4000 PRO-S, Biosys, Karben, Germany). The number of spots obtained in absence of peptide (background) was subtracted from other conditions. The number of spots/well was normalized per 10^6 cells and averaged for each replicate.

2.4.2.2. Indirect procedure

To allow the proliferation of peptide specific T-cells, spleen and lymph nodes cells were cultured in a 6-well flat-bottom plate ($5 \cdot 10^6$ cells/mL) in RPMI 10% FCS, in the presence of epitope peptides (10 µg/mL) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere for 3 days. On day 2, half of the supernatant was replaced with fresh culture medium containing 20 UI/mL recombinant human IL-2. Cells were harvested on day 3, centrifuged at 200 g for 5 min and resuspended in RPMI medium with 2% normal mouse serum. A standard ELISpot assay was then performed (see above).

2.5. Assessment of antitumor activity

28 days after tumor injection, mice were sacrificed for enumeration of pulmonary tumor nodules. Mice lungs were contrasted by intratracheal injection of 15% India ink solution, followed by bleaching into a Fekete's solution. For each mouse, the number of white tumor nodules on the black surface of lungs was counted with a magnifier lamp.

3. Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. Statistical differences between results obtained in the ELISpot assay were determined by a two-way ANOVA, carried out with the GraphPad Prism 7.0 software. A Kruskal-Wallis test was performed for the comparison of tumor count (one-way non parametric ANOVA). Difference between groups was considered statistically significant for $p < 0.05$ (one symbol), $p < 0.01$ (two symbols) or $p < 0.001$ (three symbols). Each experiment was conducted at least two times using 4-5 animals per group.

Results and Discussion

1. Physicochemical characterization of peptide-based liposomal constructs

The aim of this study was to develop a new peptide-based liposomal vaccine, which contains two epitope peptides (CD4 and CD8 epitopes) and an adjuvant, chosen among agonists of the TLR or NLR family. To select optimal components, liposomal formulations, with an increasing degree of complexity, were conceived according to a classical lipid film hydration method followed by sonication (**Table 1**). The vesicles were obtained from egg phosphatidylcholine, phosphatidyl-glycerol and cholesterol in a ~54/13/33 molar ratio, and a thiol-reactive maleimide anchor DPGmal was added at a molar ratio of 5. Mono-epitope liposomal constructs were prepared by conjugation of CD4 epitope (HA or TT peptides) to the surface of preformed SUV. Equimolar quantities of CD4 (HA peptide) and CD8 epitopes (CE7 or E7C peptides) were conjugated to the liposomes, for the formation of di-epitope constructs. Every peptide-based liposomes also carried one amphipathic adjuvant: a TLR2/6 agonist (Pam₂CAG), a TLR4 agonist (MPLA) or a NOD1 agonist (C12iEDAP).

As described on **Table 2**, liposomal constructs exhibited a mean diameter around 60 nm for plain liposomes or mono-epitope formulations and 75 nm for di-epitope liposomes, regardless of their composition. All formulations presented a monodisperse size distribution (PDI<0.3) with a narrow distribution, except for TT-Pam₂CAG liposomes, which had a polydispersity index of 0.461. The observed hydrophobicity of TT peptide could have disturbed the homogeneity of the suspension during the coupling process. Zeta potentials were negative; their variability (-47 to -65 mV) might be attributed to the presence of bilayer components hiding the negative charge of PG. The overall yield of peptide binding always exceeded 75% of the external surface-exposed maleimide functions whatever the chosen peptide or peptide combination.

Altogether, those formulations presented specific features (size below 100 nm and negative surface charge) which will allow them to be efficiently drained by the lymphatic system or endocytosed rapidly by DC at the site of injection [32,33]. The liposomal formulation process and the peptide conjugation method were reproducible and efficient.

Table 2. Physicochemical properties of liposome-based constructs.

Results are the mean of at least 4 independent formulations (with 3 consecutive measurements in each preparation). Measurements were performed after thawing at room temperature.

Vaccine constructs	Size		Zeta potential (mV)	Peptide coupling rate (%)	Adjuvant ($\mu\text{g}/\text{injection}$)	
	Average diameter (nm)	PDI				
Plain lp.	60 \pm 12	0.209	-63 \pm 9	-	-	
Lp. HA-Pam2CAG 0.1%	56 \pm 11	0.236	-50 \pm 8	80	2	
Lp. TT-Pam2CAG 0.1%	57 \pm 14	0.461	-47 \pm 6	75	2	
Lp. HA-CE7-Pam2CAG 0.1%	79 \pm 30	0.285	-53 \pm 6	79	2	
Lp. HA-E7C-Pam2CAG 0.1%	67 \pm 21	0.289	-63 \pm 5	81	2	
Lp. HA-E7C-MPLA	0.00067%	72 \pm 16	0.200	-49 \pm 6	76	0.02
	0.0067%	83 \pm 16	0.203	-61 \pm 8	80	0.2
Lp. HA-E7C-C12iEDAP	0.23%	72 \pm 16	0.281	-59 \pm 7	94	2
	2.3%	79 \pm 12	0.230	-65 \pm 9	77	20

PDI: polydispersity index, Pam2CAG: dipalmitoyl-cysteine-alanyl-glycine, MPLA: monophosphoryl lipid A, C12iEDAP: acylated derivative of the dipeptide γ -D-Glu-mDAP

2. Selection of the CD4⁺ T-cell epitope

To select a potential CD4 epitope that can be used in a vaccine platform, we evaluated the antigenicity of two well-known universal peptide epitopes: HA 307-319 peptide from influenza virus and TT 830-844 peptide from tetanus toxin, each conjugated to liposomal constructs. Those peptides were selected because the majority of human population is expected to possess memory CD4⁺ T-cells against these proteins, since influenza virus infection is ubiquitous and tetanus toxin vaccine widespread. Moreover, selected peptides were already reported to induce CD4⁺ T-cell responses in humans and mice expressing different haplotypes of MHC class-II [34–36].

The analysis of immune response induced by peptides tethering to liposomes was performed by measuring the specific cellular response *in vivo* in mouse. As activation of adaptive immune response requires stimulation of innate immunity, TLR2/6 agonist (Pam₂CAG) was added in the liposomal constructs. This adjuvant was previously developed in our team and evaluated in BALB/c mice with success [30]. Each formulation containing HA or TT peptides associated to adjuvanted liposomes was injected by s.c. route on the right flank of tumor-free C57BL/6J mice. Ten days after, specific immune response was determined by measuring the number of IFN- γ producing splenocytes when stimulated with peptides *ex vivo* during an ELISpot assay. Plain liposomes (containing only lipids) were used as negative control.

A high number of HA specific IFN- γ producing T-cells was observed in mice treated with HA peptide tethered to adjuvanted liposomes, showing that HA is recognized by T cells in these mice (**Figure 2**). On contrary, when we focused on mice treated with TT-liposomes, a similar response was observed with TT peptide and an irrelevant peptide. The lack of specific immune response observed with this construction suggests that TT peptide is not able to induce an immune response when attached to liposomes. This could be a consequence of the heterogeneity of this liposomal formulation already observed in terms of physicochemical properties (PDI>0.3, **Table 2**) or inherent to TT peptide antigenicity.

To discriminate between these two possibilities, HA and TT epitope peptides were conjugated to a carrier protein (KLH) and injected in mice emulsified in a conventional potent adjuvant, alum. As expected, a significant specific cellular immune response was observed in mice injected with HA conjugated to KLH, while KLH-conjugated TT construct was unable to induce a specific response showing that TT is not antigenic in C57BL/6J mice (**Figure 2**). These results are in accordance with experiments showing a poor binding of TT peptide to MHC class-II subclass expressed in C57BL/6J mice (I-A^b molecules) [37].

In conclusion, HA peptide was able to induce the differentiation of specific CD4⁺ T-cells no matter which type of vaccinal system was used. The conjugation of HA to the surface of liposomes didn't disturb antigen presentation process, allowing peptide binding to MHC class-II and its presentation at the surface of DC. These results showed that HA peptide was a potent activator of CD4⁺ T-cells in this model and was thus selected for its use as CD4 epitope in the following liposomal constructions. Furthermore, we validated our methodology for the screening of epitopes in tumor-free mice and confirmed that DPGmal-containing liposomes are good delivery systems for antigenic peptide.

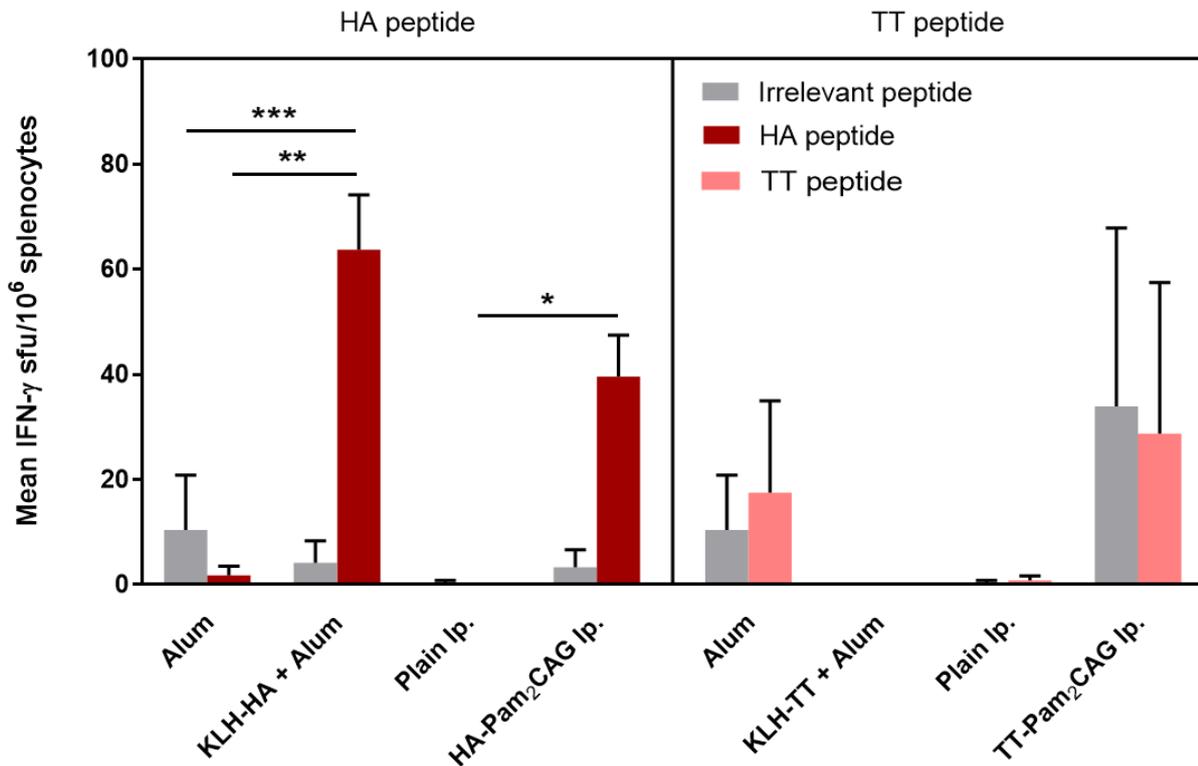


Figure 2. In vivo screening for CD4 epitope candidates by IFN- γ ELISPOT assay in tumor-free mice.

Mice received one s.c. injection of vaccine constructs containing 15 μ g of HA or TT peptide, or a dose equivalent of control (Plain Ip. or Alum). Then splenocytes from $n=5$ animals per group were collected, pooled and pulsed with either HA (left panel) or TT peptide (right panel). After 72 h of incubation (indirect procedure), ELISpot assay was performed in presence of CD4 peptides or an irrelevant peptide used as negative control (MART peptide), plates were scanned and spot numbers were analyzed. Data are shown as the average number of spots per 10⁶ splenocytes \pm SEM from three replicate wells per condition. The number of spots in absence of peptide or tumors cells was subtracted from each value. Significant p -values between vaccines or peptide groups are shown, $n=2$, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), as determined by a two-way ANOVA.

3. Selection of the CD8⁺ T-cell epitope

After the selection of the CD4 epitope, we chose a tumor specific CD8 epitope, which conditioned the specificity of induced immune responses. The tumor model used in this study is the TC-1 murine tumor cell line, expressing the E7 oncoprotein from HPV16. Previous studies on this model had identified a TAA that is essential for the design of targeted immunotherapy. Furthermore, TC-1 is a good preclinical model for human tumors transformed by HPV, such as non-small-cell lung cancer (NSCLC) or cervix cancer [38,39]. The 49-57 peptide from E7 was already described to be antigenic in C57BL/6J mice and to induce an antitumor immune response against TC-1 cells after mouse immunizations [29,40]. Thus, we decided to evaluate the specific cellular immune response ability induced by this peptide tethered to the liposome.

Because of the coupling strategy (see Materials and Methods), a cysteine was added either at the N- or C-terminal part of the peptide sequence to allow conjugation at the surface of liposome through maleimide residue. As residue addition can alter the antigenicity of CD8 epitope, CE7 and E7C peptides were both assessed *in vivo*. In addition of the pre-selected CD4 epitope (HA peptide), each E7 peptides were conjugated to adjuvanted liposome containing Pam₂CAG and injected twice at day 0 and 14 into C57BL/6J mice. Seven days after the last immunization, spleen cells were harvested and the number of peptide specific IFN- γ producing T-cells was enumerated.

The addition of a second peptide at the surface of liposome didn't impair the capacity of HA peptide to elicit a specific CD4⁺ T-cell response, which was detectable in each group injected with HA-containing formulations (**Figure 3**). However, only liposomal construct containing E7C peptide was able to induce the differentiation of specific CD8⁺ T-cells, as

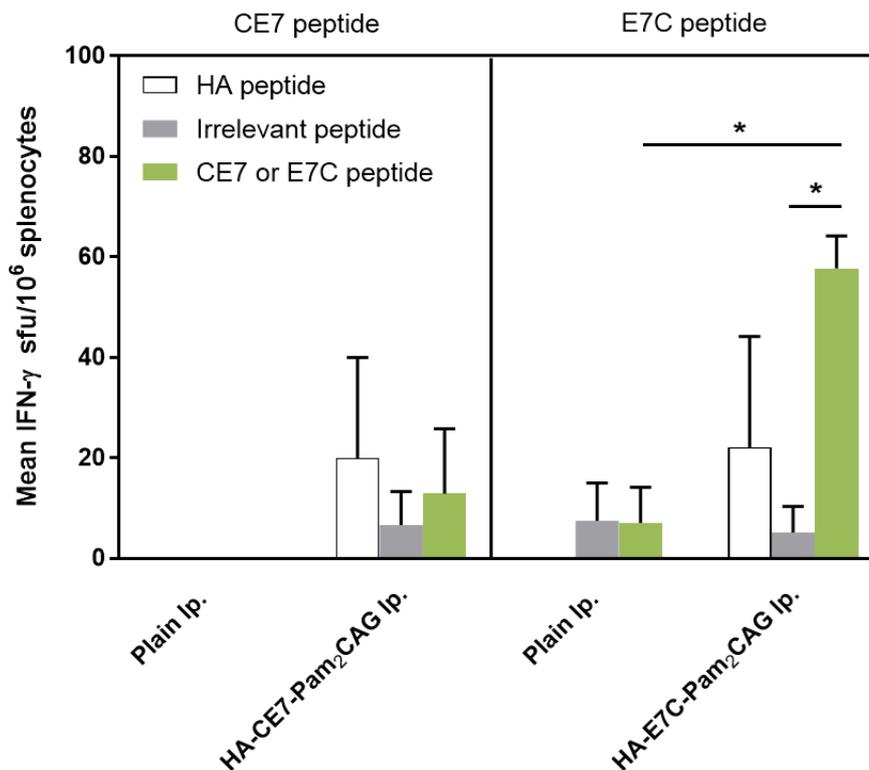


Figure 3. In vivo screening for E7 peptides by IFN- γ ELISPOT assay in tumor-free mice.

Mice received two s.c. injections of vaccine constructs at day 0 and 14, containing 15 μ g of E7 peptide, or a dose equivalent of control (Plain Ip.). Then splenocytes from $n=5$ animals per group were collected, pooled and pulsed with either CE7 (left panel) or E7C peptide (right panel). After 72 h of incubation (indirect procedure), the ELISpot assay was performed in presence of HA, CE7, E7C or an irrelevant peptide (MART peptide) used a negative control, plates were scanned and spot numbers were analyzed. Data are shown as the average number of spots per 10⁶ splenocytes \pm SEM from three replicate wells per condition. The number of spots in absence of peptide was subtracted from each value. Significant p -values between vaccine or peptide groups are shown, $n=2$, $p<0.05$ (*), as determined by a two-way Anova.

shown by a significant increase of IFN- γ producing T-cells (right panel). N-terminal addition of a cysteine in E7 peptide sequence (CE7) seemed to have impaired its ability to induce a specific immune response.

No considerable differences between liposomal formulations containing CE7 or E7C were observed in term of physicochemical properties (diameter, zeta potential or peptide coupling rate, **Table 2**). We hypothesize that N-terminal cysteine addition on E7 peptide disturbed the antigen processing by DC or the peptide association to MHC class-I molecules. Even though most studies focused on MHC class-II epitopes, it was already shown that modification of flanking residues in peptides can affect the outcome of the specific cellular immune response [41]. To conclude, we successfully developed a suitable platform for vaccine design, where di-epitope liposomal constructs can be used to select CD4/CD8 epitopes through an easy screening on tumor-free mice. Thanks to these screening steps, E7C and HA peptides were selected as the most promising combination of epitopes able to induce a specific immune response in C57BL/6J mice.

4. Evaluation of the antitumor activity of liposome-based vaccines containing three different PRR agonists

After the selection of CD4 and CD8 epitopes, complete peptide-based liposomes, containing these epitopes associated to PRR agonists, were injected in tumor-bearing mice to evaluate their antitumor activity. So far, liposomal formulations used in this project contained the Pam₂CAG, a TLR2/6 agonist synthesized in our laboratory which have already given promising results as vaccine adjuvant in BALB/c mouse models [26,27]. Two other promising PRR agonists were evaluated as potential cancer vaccine adjuvant: TLR4 agonist (monophosphoryl lipid-A, MPLA) and NOD1 agonist (C12iEDAP). MPLA is one of the most commonly used PRR agonist for therapeutic vaccines and has already entered several clinical trials [18]. NOD1 agonists were also considered as potent adjuvants to unleash Th2 immune response and in some cases Th1 immunity [42].

Thus, liposomes containing a combination of HA and E7C peptide epitopes associated with one of the 3 adjuvants were conceived. To evaluate the effectiveness of each adjuvant, two different doses were assessed (see **Table 2**), except for the TLR2/6 agonist whose concentration was taken from our previous studies in another tumor mouse model [27]. TC-1 tumor cells were injected intravenously in the tail vein of mice, leading to the formation of orthotopic pulmonary nodules. At day 2 and 4 after tumor implantation, mice

received therapeutic injections of liposomal vaccines and their capacity to inhibit tumor growth was measured by counting tumor lung nodules after 28 days.

All PRR agonists associated with pre-selected peptide epitopes were able to induce a significant tumor regression in comparison with the control group, at one particular dosage (Figure 4). At the highest dosage (0.2 $\mu\text{g}/\text{injection}$), MPLA (TLR4 agonist)-conjugated

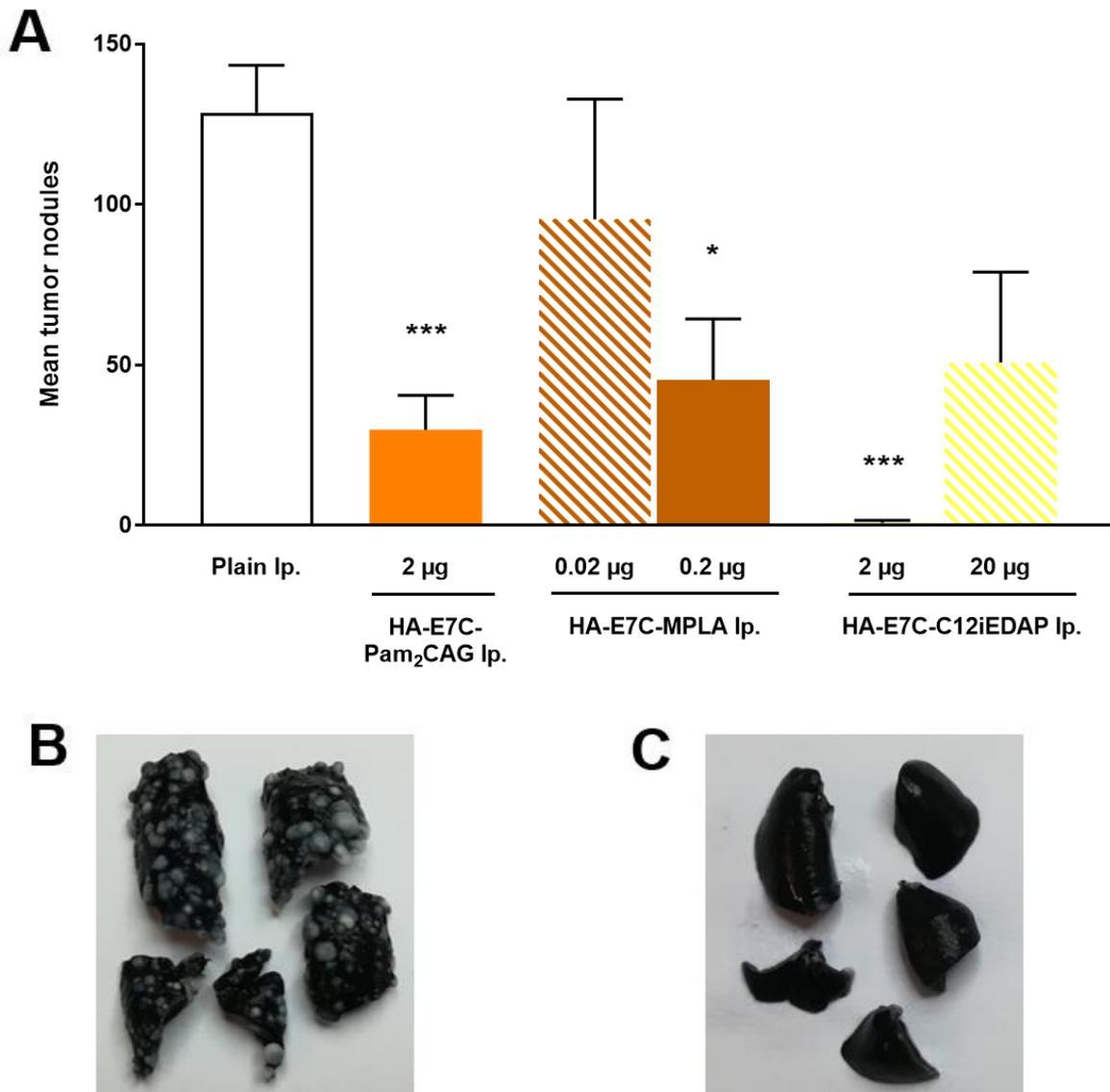


Figure 4. Influence of adjuvants in the liposomal vaccines on the antitumor activity of the construct.

(A) After an i.v. injection of TC-1 cells, mice received two s.c. vaccination of liposomal constructs at day 2 and 4, containing 15 μg of E7 peptide, or a lipid dose equivalent (Plain Ip.). At day 28, lungs were also collected, contrasted by intratracheal injection of 15% india ink and decolorated in a Fekete solution overnight. Tumor nodules were counted as white nodules on the black lungs tissue. Data represent the mean \pm SEM of $n > 4$ animals. Statistically differences between groups are represented, $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***), as determined using the Kruskal-Wallis test. (B-C) Pictures of representative India ink-filled lungs. Mice were treated with plain liposomes (B) or HA-E7C-C12iEDAP liposomes (C).

liposomes presented a significant antitumor efficacy similar to Pam₂CAG (TLR2/6 agonist at 2 µg/injection) liposomes. C12iEDAP containing liposome (NOD1 agonist) was very effective at 2 µg, even though NOD1 ligands were described to induce mainly Th2 immunity in the literature [43]. Surprisingly, a 10-times higher dose of liposomes containing C12iEDAP induced a loss of efficacy. The amount of adjuvant might have elicited an excessive inflammation, that could be detrimental as already shown with high or repeated dosage of various PRR agonists [44].

To go further in the study of the immune response induced by our vaccine constructs, we evaluated the antitumor activity of mono-epitope vaccines, without the tumor-specific epitope. We chose liposomes containing TLR2/6 agonist as adjuvant to establish a proof of principle. For this, liposomes with HA epitope alone or a combination of HA and E7C peptides associated with TLR2/6 agonist were formulated. Those formulations were injected following the same injection schedule as before. After 28 days, induced immune responses and inhibition of tumor growth were analyzed. Mice treated with a di-epitope vaccine showed significantly smaller number of tumor lung nodules compared to plain liposomes or the mono-epitope formulation (**Figure 5A**). In correlation with antitumor activity, only mice treated with HA-E7C-Pam₂CAG liposomes possessed an important number of IFN-γ producing T-cells specific for the E7 peptide in the spleen (**Figure 5B**, left panel), as well as in the draining lymph nodes (**Figure 5B**, right panel). We also detected a higher number of T-cells specific to TC-1 tumor cells in the mice treated with the diepitope construct, even though it was not statistically significant. No immune response against the HA peptide was observed in this experiment, due to the injection schedule which didn't allow the detection of CD4⁺ response (analysis is performed 24 days after the last treatment). The presence of a tumor-specific CD8 epitope in liposomal vaccines seemed to be essential for the induction of tumor growth regression in this model, which indicates that our treatment acted *via* the induction of a specific immune response.

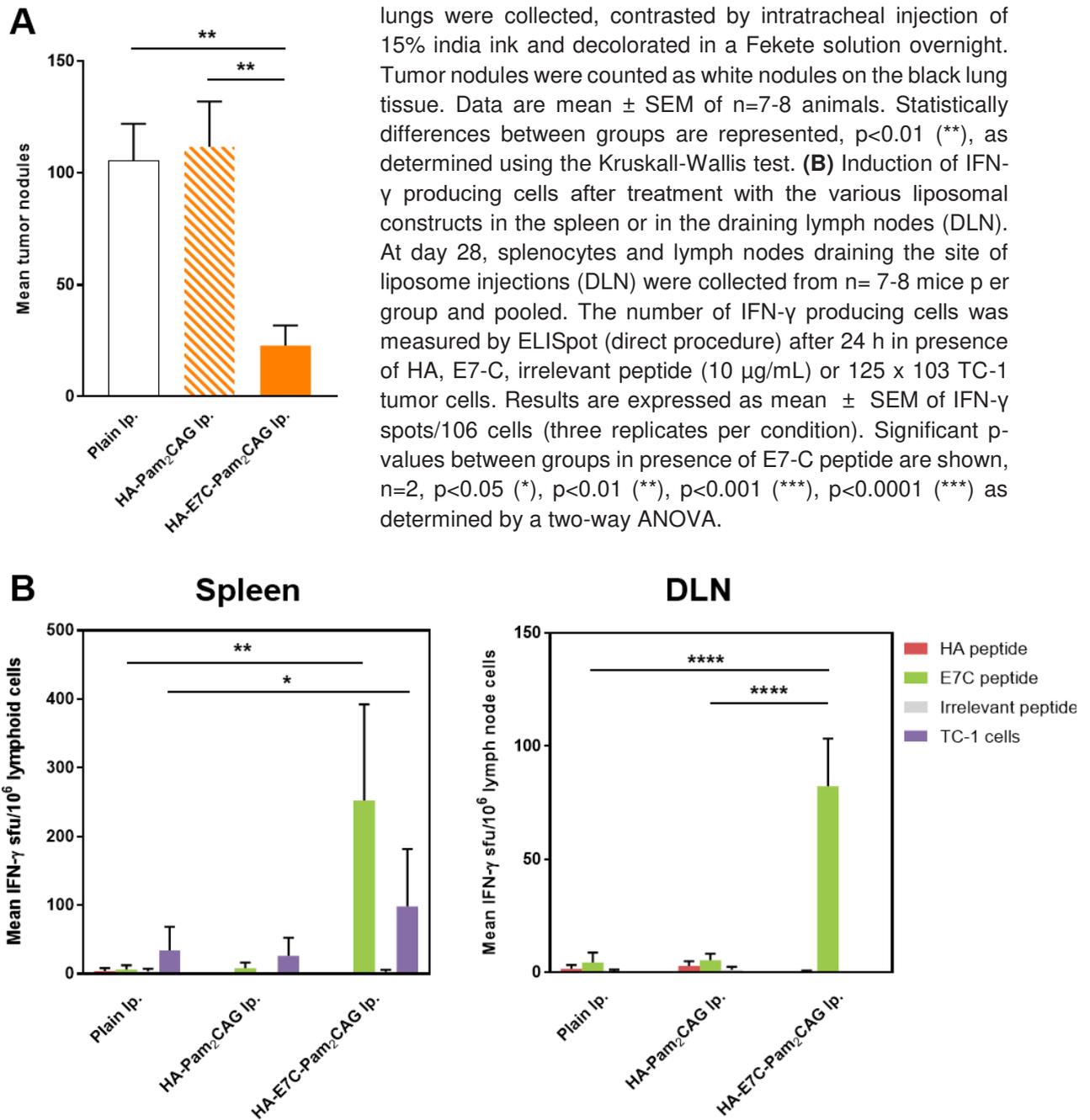
Thus by taking advantage of the inherent property of liposomes, which can incorporate amphiphilic molecules, the adjuvant capacity of TLR2/6, TLR4 and NOD1 agonists was evaluated and their respective optimal dose was found. We successfully developed three cancer vaccines able to induce a specific immune response and a potent antitumor activity against TC-1 cells.

Interestingly, ligands with different signaling pathways all triggered a specific immune response within peptide-based liposomes. More insight in the understanding of the mechanism of action of this liposomal vaccines will help identified specific immune features

required for their efficacy. In the emerging field of personalized medicine, vaccines with the same specificity but different type of danger signals could be really useful for adapting cancer treatments to each patient

Figure 5. Specificity of immune response induced by peptide-based liposome

(A) Antitumor efficacy of liposomal vaccine in a lung tumor model. After an i.v. injection of TC-1 cells, mice received two s.c. vaccination of liposomal constructs at day 2 and 4, containing 15 μ g of HA or E7 peptide, or a lipid dose equivalent (Plain Ip). 28 days after, lungs were collected, contrasted by intratracheal injection of 15% india ink and decolorated in a Fekete solution overnight. Tumor nodules were counted as white nodules on the black lung tissue. Data are mean \pm SEM of n=7-8 animals. Statistically differences between groups are represented, $p < 0.01$ (**), as determined using the Kruskal-Wallis test. (B) Induction of IFN- γ producing cells after treatment with the various liposomal constructs in the spleen or in the draining lymph nodes (DLN). At day 28, splenocytes and lymph nodes draining the site of liposome injections (DLN) were collected from n= 7-8 mice per group and pooled. The number of IFN- γ producing cells was measured by ELISpot (direct procedure) after 24 h in presence of HA, E7-C, irrelevant peptide (10 μ g/mL) or 125 x 10³ TC-1 tumor cells. Results are expressed as mean \pm SEM of IFN- γ spots/10⁶ cells (three replicates per condition). Significant p-values between groups in presence of E7-C peptide are shown, n=2, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) as determined by a two-way ANOVA.



Conclusions

In this project, we optimized a platform that allows the selection of vaccinal components during a short and easy screening in tumor-free mice. Thanks to those screening steps, three treatments were developed, which were able to induce a specific immune response and an antitumor activity in a murine model of lung cancer. In previous studies, we demonstrated the antitumor efficacy of Pam₂CAG adjuvanted peptide-based liposomes against the renal carcinoma RenCa cells expressing human ErbB2 protein in BALB/c mice [27]. The versatility of our approach should permit to develop fully customized vaccines according to specific features of targeted cancer cells.

Considering that only the CD8 epitope has to be specific of the tumor, liposomal platform containing a universal peptide and an adjuvant could be personalized by adding a TAA from any kind of cancer. Technological advances in genomics which allow the rapid identification of TAA from tumor biopsies should be associated with our strategy to allow the rational selection of vaccine targets for the development of therapy customized to patient's individual tumor [45,46].

Acknowledgments

This work was supported by “Alsace contre le Cancer”, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Strasbourg. Célia Jacobberger-Foissac is a recipient of a PhD grant from the french Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, and from “La Ligue contre le Cancer” (grant number IP-SCG-JD-14779) during the 4th year.

References

- [1] P. van der Bruggen, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, T. Boon, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, *Science*. 254 (1991) 1643–1647. doi:10.1126/science.1840703.
- [2] P.G. Coulie, B.J. Van den Eynde, P. van der Bruggen, T. Boon, Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer*. 14 (2014) 135–146. doi:10.1038/nrc3670.
- [3] O.J. Finn, Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow, *Cancer Immunol. Res.* 5 (2017) 347–354. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0112.
- [4] A.K. Palucka, L.M. Coussens, The Basis of Oncoimmunology, *Cell*. 164 (2016) 1233–1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049.
- [5] H.-J. Kim, H. Cantor, CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful, *Cancer Immunol. Res.* 2 (2014) 91–98. doi:10.1158/2326-6066.
- [6] R. Kennedy, E. Celis, Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses, *Immunol. Rev.* 222 (2008) 129–144. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x.
- [7] C. Fayolle, E. Deriaud, C. Leclerc, In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help., *J. Immunol.* 147 (1991) 4069–4073.
- [8] F. Ossendorp, E. Mengedé, M. Camps, R. Filius, C.J.M. Melief, Specific T Helper Cell Requirement for Optimal Induction of Cytotoxic T Lymphocytes against Major Histocompatibility Complex Class II Negative Tumors, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 693–702.
- [9] T. Nishimura, K. Iwakabe, M. Sekimoto, Y. Ohmi, T. Yahata, M. Nakui, T. Sato, S. Habu, H. Tashiro, M. Sato, A. Ohta, Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 617–627.
- [10] G.Q. Phan, C.E. Touloukian, J.C. Yang, N.P. Restifo, R.M. Sherry, P. Hwu, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, C.A. Seipp, L.J. Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, S.A. Rosenberg, Immunization of Patients with Metastatic Melanoma Using Both Class I- and Class II-restricted Peptides from Melanoma-associated Antigens, *J. Immunother.* 26 (2003) 349–356.
- [11] E.H.J.G. Aarntzen, I.J.M.D. Vries, W.J. Lesterhuis, D. Schuurhuis, J.F.M. Jacobs, K. Bol, G. Schreiber, R. Mus, J.H.W.D. Wilt, J.B.A.G. Haanen, D. Schadendorf, A. Croockewit, W.A.M. Blokx, M.M.V. Rossum, W.W. Kwok, G.J. Adema, C.J.A. Punt, C.G. Figdor, Targeting CD4+ T-Helper Cells Improves the Induction of Antitumor Responses in Dendritic Cell-Based Vaccination, *Cancer Res.* 73 (2013) 19–29. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1127.
- [12] N. Casares, J.J. Lasarte, A.L.-D. de Cerio, P. Sarobe, M. Ruiz, I. Melero, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity, *Eur. J.*

- Immunol. 31 (2001) 1780–1789. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1780::AID-IMMU1780>3.0.CO;2-I.
- [13] R. Kennedy, E. Celis, T Helper Lymphocytes Rescue CTL from Activation-Induced Cell Death, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 177 (2006) 2862–2872. doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2862.
- [14] C.L. Slingsluff, The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination?, *Cancer J. Sudbury Mass.* 17 (2011) 343–350. doi:10.1097/PPO.0b013e318233e5b2.
- [15] A.H. Banday, S. Jeelani, V.J. Hruby, Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37 (2015) 1–11. doi:10.3109/08923973.2014.971963.
- [16] H. Khong, W.W. Overwijk, Adjuvants for peptide-based cancer vaccines, *J. Immunother. Cancer.* 4 (2016). doi:10.1186/s40425-016-0160-y.
- [17] S.L. Demento, A.L. Siefert, A. Bandyopadhyay, F.A. Sharp, T.M. Fahmy, Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 294–306. doi:10.1016/j.tibtech.2011.02.004.
- [18] J.K. Dowling, A. Mansell, Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development, *Clin. Transl. Immunol.* 5 (2016) e85. doi:10.1038/cti.2016.22.
- [19] E. Vacchelli, L. Galluzzi, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, C. Sautès-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, Trial watch, *Oncoimmunology.* 1 (2012) 894–907. doi:10.4161/onci.20931.
- [20] C.J.M. Melief, T. van Hall, R. Arens, F. Ossendorp, S.H. van der Burg, Therapeutic cancer vaccines, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 3401–3412. doi:10.1172/JCI80009.
- [21] K.K. Wong, W.A. Li, D.J. Mooney, G. Dranoff, Advances in Therapeutic Cancer Vaccines, *Adv. Immunol.* 130 (2016) 191–249. doi:10.1016/bs.ai.2015.12.001.
- [22] J. Kim, D.J. Mooney, In Vivo Modulation of Dendritic Cells by Engineered Materials: Towards New Cancer Vaccines, *Nano Today.* 6 (2011) 466–477. doi:10.1016/j.nantod.2011.08.005.
- [23] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145–160. doi:10.1038/nrd1632.
- [24] R.A. Schwendener, Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances, *Ther. Adv. Vaccines.* 2 (2014) 159–182. doi:10.1177/2051013614541440.
- [25] A. Roth, F. Rohrbach, R. Weth, B. Frisch, F. Schuber, W.S. Wels, Induction of effective and antigen-specific antitumour immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct, *Br. J. Cancer.* 92 (2005) 1421–1429. doi:10.1038/sj.bjc.6602526.
- [26] B. Heurtault, P. Gentine, J.-S. Thomann, C. Baehr, B. Frisch, F. Pons, Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity, *Pharm. Res.* 26 (2009) 276–285. doi:10.1007/s11095-008-9724-y.
- [27] J.-S. Thomann, B. Heurtault, S. Weidner, M. Brayé, J. Beyrath, S. Fournel, F. Schuber, B. Frisch, Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting, *Biomaterials.* 32 (2011) 4574–4583. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.015.

- [28] Z. Kakhi, B. Frisch, B. Heurtault, F. Pons, Liposomal constructs for antitumoral vaccination by the nasal route, *Biochimie.* 130 (2016) 14–22. doi:10.1016/j.biochi.2016.07.003.
- [29] K.Y. Lin, F.G. Guarnieri, K.F. Staveley-O'Carroll, H.I. Levitsky, J.T. August, D.M. Pardoll, T.C. Wu, Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen, *Cancer Res.* 56 (1996) 21–26.
- [30] A. Roth, S. Espuelas, C. Thumann, B. Frisch, F. Schuber, Synthesis of thiol-reactive lipopeptide adjuvants. Incorporation into liposomes and study of their mitogenic effect on mouse splenocytes, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 541–553. doi:10.1021/bc034184t.
- [31] Z. Kakhi, B. Frisch, L. Bourel-Bonnet, J. Hemmerlé, F. Pons, B. Heurtault, Airway administration of a highly versatile peptide-based liposomal construct for local and distant antitumoral vaccination, *Int. J. Pharm.* 496 (2015) 1047–1056. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.027.
- [32] C. Oussoren, G. Storm, Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50 (2001) 143–156. doi:10.1016/S0169-409X(01)00154-5.
- [33] C. Kelly, C. Jefferies, S.-A. Cryan, Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages, *J. Drug Deliv.* 2011 (2011) 727241. doi:10.1155/2011/727241.
- [34] C. Schneider, M.H. Van Regenmortel, Immunogenicity of free synthetic peptides corresponding to T helper epitopes of the influenza HA 1 subunit. Induction of virus cross reacting CD4+ T lymphocytes in mice, *Arch. Virol.* 125 (1992) 103–119. doi:10.1007/BF01309631.
- [35] D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, G. Corradin, Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 149 (1992) 717–721.
- [36] F.-A. Le Gal, A. Prevost-Blondel, R. Lengagne, M. Bossus, F. Farace, A. Chaboissier, H. Gras-Masse, V.H. Engelhard, J.-G. Guillet, H. Gahéry-Ségard, Lipopeptide-based melanoma cancer vaccine induced a strong MART-27-35-cytotoxic T lymphocyte response in a preclinical study, *Int. J. Cancer.* 98 (2002) 221–227. doi:10.1002/ijc.10186.
- [37] J. Alexander, J. Sidney, S. Southwood, J. Ruppert, C. Oseroff, A. Maewal, K. Snoke, H.M. Serra, R.T. Kubo, A. Sette, Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides, *Immunity.* 1 (1994) 751–761. doi:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(94)80017-0.
- [38] X. Fan, K. Yu, J. Wu, J. Shao, L. Zhu, J. Zhang, Correlation between squamous cell carcinoma of the lung and human papillomavirus infection and the relationship to expression of p53 and p16, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36 (2015) 3043–3049. doi:10.1007/s13277-014-2940-7.
- [39] P.R. Prabhu, D. Jayalekshmi, M.R. Pillai, Lung Cancer and Human Papilloma Viruses (HPVs): Examining the Molecular Evidence, *J. Oncol.* 2012 (2012) 750270. doi:10.1155/2012/750270.
- [40] M. Reinis, I. Stepanek, J. Simova, J. Bieblova, H. Pribylova, M. Indrova, J. Bubenik, Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated

- tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines, *Int. J. Oncol.* 36 (2010) 545–551. doi:https://doi.org/10.3892/ijo_00000528.
- [41] K.D. Moudgil, E.E. Sercarz, I.S. Grewal, Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues, *Immunol. Today.* 19 (1998) 217–220. doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01233-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01233-4).
- [42] C. Maisonneuve, S. Bertholet, D.J. Philpott, E. De Gregorio, Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 12294–12299. doi:[10.1073/pnas.1400478111](https://doi.org/10.1073/pnas.1400478111).
- [43] J.H. Fritz, L. Le Bourhis, G. Sellge, J.G. Magalhaes, H. Fsihi, T.A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R.L. Ferrero, S.E. Girardin, D.J. Philpott, Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity, *Immunity.* 26 (2007) 445–459. doi:[10.1016/j.immuni.2007.03.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.009).
- [44] A.L. Engel, G.E. Holt, H. Lu, The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 4 (2011) 275–289. doi:[10.1586/ecp.11.5](https://doi.org/10.1586/ecp.11.5).
- [45] A. Kirner, A. Mayer-Mokler, C. Reinhardt, IMA901: a multi-peptide cancer vaccine for treatment of renal cell cancer, *Hum. Vaccines Immunother.* 10 (2014) 3179–3189. doi:[10.4161/21645515.2014.983857](https://doi.org/10.4161/21645515.2014.983857).
- [46] U. Sahin, Ö. Türeci, Personalized vaccines for cancer immunotherapy, *Science.* 359 (2018) 1355–1360. doi:[10.1126/science.aar7112](https://doi.org/10.1126/science.aar7112).

CHAPITRE 2

**Comparaison de différents vaccins
peptidiques à base de liposomes et étude
des facteurs immunitaires impliqués dans
leur effet**

Savoir que l'on sait ce que l'on sait et que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas,
voilà la véritable **intelligence**.

Confucius

A. Résumé de l'étude

1. Objectifs

Les trois vaccins prometteurs développés précédemment contenaient tous la même combinaison d'épitopes (peptides HA et E7) associée à différents adjuvants, agonistes des TLR ou NLR. Étonnamment, ces trois agonistes ont tous été capables d'induire une réponse antitumorale lorsqu'ils étaient incorporés dans les vaccins, bien qu'ils déclenchent différentes voies de signalisation dans la cellule dendritique (cf. §B.3.3.2, Introduction). En effet, deux agonistes se lient aux récepteurs extracellulaires TLR2/6 ou TLR4 qui fonctionnent en activant le facteur de transcription NF- κ B ou IFR3, respectivement (Dowling & Mansell 2016). Le troisième agoniste se lie à un NLR cytosolique qui induit la voie de signalisation des MAP kinase et est capable d'activer l'inflammasome (Philpott et al. 2014).

Dans le contexte de la médecine personnalisée, il serait intéressant de bénéficier d'une plateforme vaccinale ayant la même spécificité pour un type de tumeur mais des adjuvants différents afin d'adapter le traitement à chaque patient. En effet, des individus peuvent être plus sensibles ou résistants à certains types d'adjuvant, en fonction de leur immunité mais également de la localisation de la tumeur et de la voie d'administration du traitement. Pour permettre le développement de ce type de technologie, il est cependant nécessaire d'identifier au préalable les différents facteurs immunitaires impliqués dans l'efficacité d'un vaccin afin de connaître le profil immunitaire qui est le plus favorable à la réussite d'un traitement.

C'est pourquoi nous avons souhaité réaliser une étude plus approfondie de la réponse immunitaire induite par chacun des trois vaccins liposomiques. Le potentiel vaccinal de nos traitements a été comparé contre des stades précoces et tardifs de croissance tumorale, en augmentant le délai entre l'injection des cellules tumorales et des traitements.

2. Résultats

Suite à une étude de l'efficacité thérapeutique et de la survie des souris face à des stades plus avancés de progression tumorale, nous avons mis en évidence une différence d'efficacité entre les traitements qui n'avaient pas été observée dans le **Chapitre 1** et

montré la supériorité thérapeutique du traitement contenant un agoniste du TLR4 (Liposomes TLR4). En effet, ce traitement reste efficace lorsqu'il est administré jusqu'à deux semaines après l'injection des cellules tumorales. A ce calendrier, les nodules tumoraux peuvent déjà être détectés au niveau des poumons, et cela correspond à la moitié du temps restant à vivre aux souris (le temps de survie des souris non traitées étant de 35 jours). Les liposomes TLR4 ont également permis d'allonger significativement la survie des souris, entraînant la rémission totale des tumeurs chez 8 souris C57Bl/6J portant des nodules pulmonaires (n=14).

Une étude des mécanismes immunitaires induits par nos vaccins liposomiques a montré des divergences d'action pouvant expliquer les différences d'efficacité observées dans ce chapitre. Nous avons effectivement remarqué que la puissance de la réponse immunitaire spécifique, dirigée contre le peptide E7 et les cellules TC-1, était corrélée avec l'efficacité de chaque traitement. La réponse immunitaire induite par le vaccin le plus prometteur (liposomes TLR4.) était associée à une balance cytokinique de type Th1, caractérisée par une forte production d'IFN- γ . En réalisant une déplétion de certains sous-types immunitaires, nous avons montré que l'efficacité thérapeutique des liposomes TLR4. était dépendante de la présence des lymphocytes T CD8⁺ mais pas des T CD4⁺. Pour finir, nous avons également observé que les différents adjuvants avaient un impact différent sur la migration et l'activation de certains sous-types de DC migratoires ou résidentes des ganglions lymphatiques. Curieusement, l'injection s.c. de l'agoniste du TLR4 n'a pas induit d'activation visible des DC mais a, par contre, déclenché une très forte migration des cellules dendritiques du derme de type CD103⁻ vers les ganglions lymphatiques. Cette sous-population de DC est connue pour être spécialisée dans le mécanisme de cross-présentation d'antigènes tumoraux (del Rio et al. 2007; Wylie et al. 2015).

Bien qu'étant capable d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1, le vaccin contenant un ligand du TLR2/6 n'était pas efficace contre des stades tardifs de croissance tumorale et n'a pas permis d'allonger la survie des souris. De manière surprenante, ce traitement a permis la maturation des DC du derme CD103⁺ et CD103⁻, sans que leur nombre ait augmenté dans les ganglions. Cette observation laisse supposer que les liposomes TLR2/6 sont drainés par la lymphe et agissent directement sur les DC déjà présentes dans les ganglions lymphatiques, mais que cet effet n'était pas suffisant pour induire une réponse immunitaire puissante et durable.

Au contraire, les liposomes NOD1 n'ont pas été capables d'induire une réponse immunitaire de type Th1 et n'ont pas agi sur la maturation et la migration des DC. Ce traitement a cependant eu un effet antitumoral de courte durée, permettant de diminuer le nombre de nodules pulmonaires lors du premier mois suivant l'injection des cellules tumorales. Nous avons donc postulé que ce vaccin agissait peut-être par un mécanisme indépendant de la réponse immunitaire adaptative, par exemple en activant des lymphocytes de l'immunité innée tels que les NK ou les NKT.

3. Conclusions

L'ensemble de ces résultats renforce notre conviction que l'analyse et le suivi du profil immunitaire est une étape essentielle lors du développement d'un vaccin thérapeutique. Cette surveillance immunitaire devrait également être employée de manière systématique lors des essais cliniques afin de prévoir l'échec d'une thérapie ou permettre l'identification en amont de traitements plus adaptés au profil de chaque patient.

La comparaison d'agonistes des TLR et NLR a montré des différences dans leur capacité à induire une réponse immunitaire de type Th1. Pour poursuivre ce projet, il serait intéressant d'évaluer d'autres agonistes ou association d'agonistes afin d'augmenter la puissance de la réponse immunitaire antitumorale induite par les vaccins.

B. Article #2

"Induction of a strong and persistent antitumor immune response using liposomal vaccines adjuvanted by monophosphoryl lipid A"

Oncoimmunology, **en préparation.**

Note : Pour faciliter la lecture, les figures et les légendes de l'article ont été placées directement dans le texte.

Induction of a strong and persistent antitumor immune response using liposomal vaccines adjuvanted by monophosphoryl lipid A

Célia Jacobberger-Foissac^a, Cendrine Seguin^a, May Wantz^a, Hanadi Saliba^{a1}, Vincent Flacher^b Benoît Frisch^a, Béatrice Heurtault^{a*}✉, Sylvie Fournel^{a*}✉

^a Université de Strasbourg, CNRS, 3Bio team, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR 7199, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch Cedex, France

^b Laboratory I²CT - Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry, CNRS UPR 3572, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 Rue René Descartes 67084 Strasbourg Cedex, France

* Equal contribution

✉ Corresponding authors: Béatrice Heurtault, bheurtault@unistra.fr and Sylvie Fournel, s.fournel@unistra.fr

¹ (New affiliation) Lebanese University, Faculty of Public Health, Laboratory of Immunology, Campus Pierre Gemayel, Fanar, Lebanon

Keywords

Therapeutic vaccines; pulmonary tumors; HPV-transformed tumor; toll-like and nod-like receptor agonists; liposomal nanoparticles; delivery system.

Abbreviations

ACK, ammonium-chloride-potassium lysing buffer; APC, allophycocyanin; CD4 epitope, CD4⁺ T-cell peptidic epitope; CD8 epitope, CD8⁺ T-cell peptidic epitope; CTL, cytotoxic T-lymphocyte; DLN, draining lymph node; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HPV, human papillomavirus; Lp., liposome; MPLA, monophosphoryl lipid A; NLR, NOD-like receptor; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RenCa, renal carcinoma (tumor cell line); RPMI, Roswell Park Memorial Institute; TAA, tumor-associated antigen; Th, T helper cell; TLR, Toll-like receptor.

Disclosure of interest

The authors report no conflict of interest.

Abstract

Liposomal platform is a powerful approach for the optimization of peptides and adjuvant composition in cancer vaccines. We took advantage of a liposomal platform versatility to develop three vaccine candidates, differing only by their adjuvant composition, containing a peptide from HA influenza virus protein as CD4 epitope, a peptide from HPV16 E7 oncoprotein as CD8 epitope and TLR4, TLR2/6 or NOD1 agonists as adjuvants. Here, we compared the therapeutic potential of these three vaccinal candidates and analyzed the immunological mechanisms involved in their action. Liposomal vaccine containing MPLA as adjuvant (TLR4 liposomes), was the most effective treatment against the HPV-transformed orthotopic lung tumor model, TC-1. This vaccine induced a potent Th1-oriented antitumor immunity, which led to a significant reduction in tumor growth and a prolonged survival of mice, even when injected after pulmonary tumors apparition. TLR4 liposomes antitumor efficacy was dependent of CD8⁺ T-cell presence, whereas CD4⁺ T-cell depletion enhanced its therapeutic impact. Subcutaneous injection of this treatment induced the migration of CD103⁻ skin DCs to draining lymph nodes. We also observed unexpected differences between TLR and NLR agonists activity. In the same way as TLR4 liposomes, TLR2/6 liposomes induced a Th1-immune response but weak and not sufficient for a prolonged antitumor activity. Surprisingly, whereas NOD1 liposomes treatment resulted in the control of early tumor growth, they did not extend survival. The antitumor activity of NOD1 vaccine was not associated with a specific adaptive immune response. This study highlights the importance of immune monitoring of cancer vaccine therapy and shows that our modulable platform can be used for the strategical development of vaccines.

Introduction

Since the beginning of the 20th century, immunotherapy has emerged as an effective strategy to overcome drawbacks of standard cancer treatments by harnessing the innate and specific ability of the immune system to eliminate tumors.^{1,2} Among the different types of immunotherapies, therapeutic cancer vaccines showed tremendous beneficial activity in different animal models and are currently evaluated in several large-scale clinical studies.^{3–5} Cancer vaccines aim at delivering tumor antigens to dendritic cells (DCs), which will present them, in the form of MHC-peptides complex, to CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. The interaction between these three types of cells result in the differentiation of cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes (CTLs), able to specifically destroy cancer cells.

Peptide-based vaccines mainly focus on MHC class-I restricted tumor-specific epitope peptides. However, it is admitted that cancer vaccines should as well induce the differentiation of CD4⁺ T-lymphocytes into T-helper cells (Th) to support the desired immunologic response. To obtain this, one possibility is to use a heterologous MHC class-II restricted peptide, which stimulates recall non-tumor specific memory CD4⁺ T cells, thereby creating a favorable environment for tumor-specific CTL differentiation.^{6,7} Short peptides used in this strategy have the advantage of low-cost manufacturing and demonstrated safety. Nevertheless, they are not immunogenic and need to be combined with a potent adjuvant to trigger DC maturation and improve antigen presentation. In the last decade, agonists of different types of Toll-like and Nod-like Receptors (TLR and NLR, respectively) were investigated as vaccine adjuvants and showed promising results in clinical studies.⁸ In particular, the monophosphoryl lipid A (MPLA, a TLR4 agonist) has already received FDA approval and is already commercialized by GlaxoSmithKline as adjuvant system in combination with liposomes (AS01).⁹

The immune monitoring of cancer vaccine candidates and the understanding of their mode of action are of critical importance for their application in clinical trials.¹⁰ Collecting information about the immune response triggered by the vaccine can determine patient enrollment criteria, help defining prognosis marker and identifying new therapeutic strategies.¹¹ Most clinical studies focus on the prevalence of circulating CTLs specific to an immunized TAA epitope although this parameter does not necessarily predict a good antitumor activity.¹¹ A better anticipation of vaccination efficacy should include studies on the polarization of T helper immune responses and the measurement of circulating

cytokines, which should testify for optimal orientation of adaptive responses (i.e. Th1/Th17 rather than Th2).^{12,13} Another major mechanism of tumor resistance relies on CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells (Tregs), which suppress antitumor responses and might have a negative impact on vaccine efficacy.^{14,15} Finally, few studies with peptide based-vaccines assessed their impact on DCs, even though they play a major role in antitumor immunity.¹⁶ In particular, studies on a vaccine including MHC-I epitopes should take into consideration the targeting of DC subsets able to perform cross-presentation of exogenous peptides.¹⁷ The most prominent DCs with this capacity are conventional type 1 DCs (cDC1: dermal Langerin/CD207⁺ CD103⁺ DCs and lymph-node resident CD8 α ⁺ DCs),¹⁸ although cross-presentation might be promoted by maturation conditions in Langerhans cells,^{19,20} or dermal conventional type 2 DCs (Langerin/CD207⁻ CD103⁻ cDC2).²¹

In this context, we developed a vaccination platform made of lipid nanoparticles (liposomes), able to co-deliver both MHC class-I and class-II epitope peptides associated with various agonists of TLR or NLR. In our platform, the CD8⁺ T-cell peptide epitope (referred as CD8 epitope) is a tumor-specific peptide, enabling a cytotoxic response restricted to tumor cells. The CD4⁺ T-cell peptide epitope (referred as CD4 epitope) is a universal helper peptide, which binds a wide range of MHC class-II human and mouse alleles and is derived from an antigen sufficiently widespread to ensure the presence of memory cells in a large part of the human population for a future clinical application of our platform.²² Once optimized, the CD8 epitope present in our construct might be tunable in order to address different types of cancer.

In a previous study, we evaluated liposomes co-delivering ErbB2-derived CD8⁺ peptide epitope, a universal helper peptide from influenza virus, and a synthetic TLR2/6 agonist (Pam₂CAG) in a mouse model of subcutaneously implanted renal carcinoma (RenCa) expressing human ErbB2 protein. A s.c. administration of this construct led to a potent antitumor activity in both prophylactic and therapeutic injection schedules.^{23,24}

These encouraging results prompted us to exploit the versatility of our construct to decipher the antitumor immune response induced by our vaccination platform in a model of HPV (human papillomavirus)-16 transformed cancer cells. For this, three peptide-based liposomal vaccines were conceived, containing two epitopes: a tumor-specific CD8⁺ peptide derived from the HPV16 E7 oncogene and an influenza-derived CD4⁺ peptide used in our previous studies in association with either TLR2/6, TLR4 or NOD1 agonists. The antitumor activity of the three vaccine candidates was assessed against the TC-1 cell line,

which is E7-transformed tumor cells derived from murine pulmonary epithelial cells. In addition to having an identified tumor-associated antigen (TAA), TC-1 cell line is also a well-described preclinical model for human tumors transformed by HPV, such as non-small-cell lung cancer (NSCLC) or cervix cancer, which are amongst the deadliest cancer forms in the world ^{25,26}. The therapeutic effects, as well as the immune responses induced by our three constructs, were deciphered *in vivo* after s.c. injections at different stages of cancer progression.

Results

Physicochemical characterization of liposomal constructs

Three liposomal formulations were conceived, containing two peptide epitopes, HA peptide (MHC class-II restricted) derived from hemagglutinin A influenza virus protein, and E7 peptide (MHC class-I restricted) derived from HPV16 oncoprotein, in association with one type of adjuvant: TLR2/6, TLR4 or NOD1 agonists (**Table S1**). These constructs were characterized to determine their physicochemical properties. Additionally, the amount of peptides and agonist was determined (**Table S2**). Each liposomal formulation exhibited a uniform size distribution with a mean diameter around 70 nm for plain liposomes (negative control, without peptides and agonist) and 83 nm for liposomes with peptides and adjuvant, regardless of their composition. The surface charge was invariably negative (-51 to -61 mV) and the peptide binding rate to the surface of liposome always exceeded 78%. These specific features (size below 100 nm and negative surface charge) will allow them to be efficiently drained by the lymphatic system or endocytosed rapidly by DCs at the site of injection.^{27,28}

Antitumor efficacy and therapeutic time window

To evaluate the antitumor activity of vaccine candidates in the TC-1 orthotopic pulmonary tumor model, therapeutic vaccinations were performed after injection of TC-1 cells in the tail vein of C57BL/6J mice. Given that pulmonary nodules were detectable 8 days after TC-1 cells i.v. injection (**Fig. S1**), vaccine candidates were injected at various time points, ranging from day 2 to day 14, in order to evaluate their therapeutic effect at different stages of cancer progression. One month after tumor cell injection, lungs were harvested and contrasted for pulmonary tumor nodules counting. Liposomal vaccine containing the TLR2/6 agonist was no longer effective when injected 8 days after tumor injection (**Fig. 1A**). In contrary, liposomes containing TLR4 or NOD1 agonists were able to reduce the tumor growth even when injected after pulmonary nodules apparition, up to an efficiency limit at day 12 (**Fig. 1B, C**). Survival rate of mice treated with the three vaccine candidates was assessed after therapeutic injections during an early stage of cancer progression (days 2-4) or after the apparition of pulmonary nodules (days 10-12). Consistent with the

previous observations, treatment with TLR2/6 liposomes increased survival only of animals treated at days 2-4 (**Fig. 1D**) but was ineffective when the treatment was administered after nodules apparition (**Fig. 1E**). TLR4 liposomes were significantly efficient in both administration schedules. Strikingly, when injected at days 10-12, this vaccine allowed complete tumor regression in 8 mice out of 14, which remained pulmonary nodules-free after 3 months (**Fig. 1E**). Surprisingly, under both schedules, NOD1 liposomes failed to extend survival (**Fig. 1D, E**), although a decrease of nodule amounts was observed 28 days after tumor cells injection. All these results suggested that the three vaccine constructs induced antitumor responses that differ from each other in a quantitative and/or qualitative way.

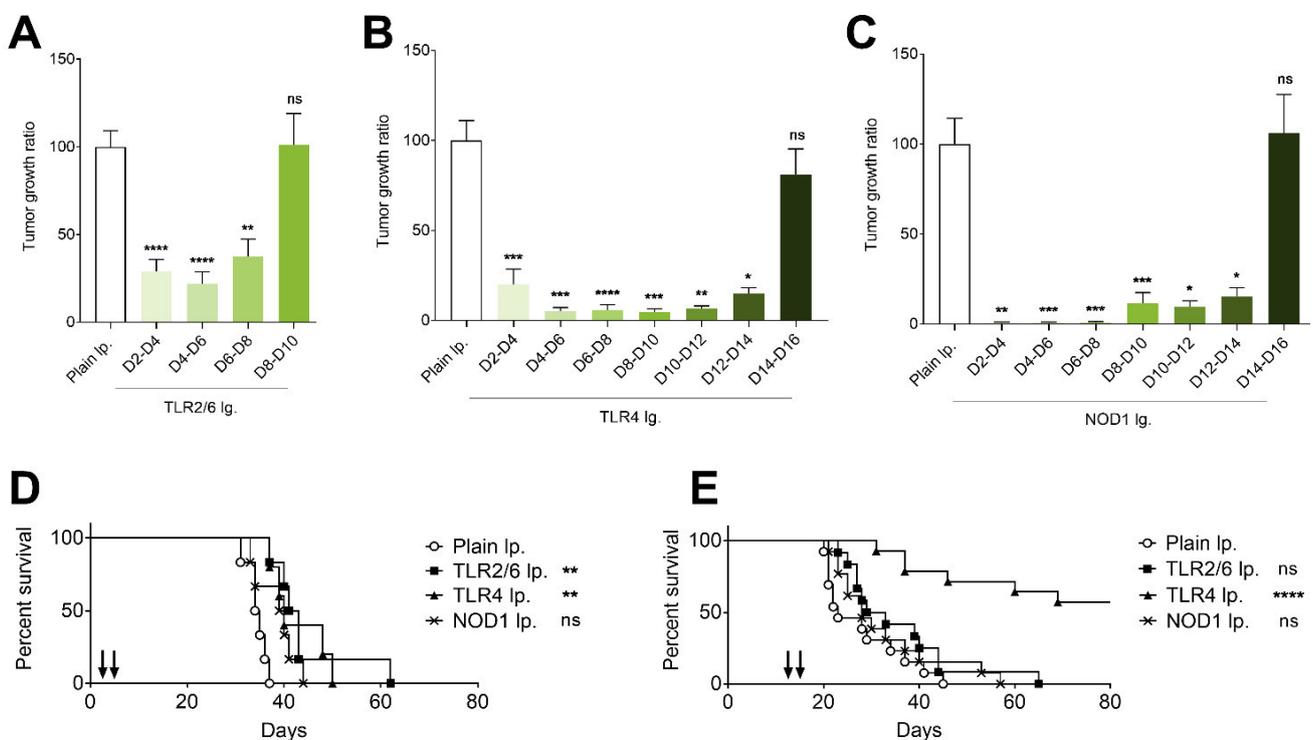


Figure 1. Therapeutic efficacy of adjuvanted liposomal vaccines in an orthotopic lung tumor model.

(A-C) Antitumor activity at various stage of cancer progression, delay of the injection schedule.

After an i.v. injection of $1 \cdot 10^5$ TC-1 cells, mice received two s.c. immunizations (2 injections, 2-d interval) of plain liposomes at days 2 and 4, or liposomal constructs containing TLR2/6 (**A**), TLR4 (**B**), or NOD1 (**C**) agonists at different times, beginning at day 2 until day 14 after tumor implantation. At day 28, mice lungs were collected, contrasted by intratracheal injection of 15% india ink and decolorated in a Fekete solution overnight. Data represent mean \pm SEM of tumor nodules count, $n > 7$. **(D-E) Survival rate of mice after therapeutic vaccination.** After tumor cells injection, s.c. administrations of liposomal constructs were performed at days 2 and 4 (**D**) or days 10 and 12 (**E**). Percentages of mice survival are shown. Statistically differences between groups were determined using a one-way ANOVA or a log rank test.

Monitoring of antitumor immunity

To better understand the difference of therapeutic efficacy previously observed, we compared the tumor-specific adaptive immune response induced by the three vaccine candidates in tumor-bearing mice. Therapeutic vaccinations were performed at days 2-4 after i.v. injection of TC-1 cells. One month later, the systemic (spleen) and local immune responses (lymph nodes draining the injection site, DLNs) were evaluated by *ex vivo* counts of IFN- γ producing T-cells reacting to vaccine epitopes or tumor cells in an ELISpot assay. A high number of E7-specific IFN- γ producing T-cells were observed in mice treated with TLR2/6 liposomes in the spleen but not in the lymph nodes (**Fig. 2A**). On the other hand, TLR4 liposomes induced a significant adaptive immune response in both the spleen and lymph nodes. In consistence with results observed on mouse survival (**Fig. 1D, E**), NOD1 liposomes failed to induce the differentiation of a high number of E7 specific IFN- γ producing T-cells, in both immune compartments. A TC-1-specific response was only observed after TLR4 liposome treatment.

Th1 polarization is mandatory for the differentiation of potent CTLs, the activation of innate cytotoxic immune cells and has been correlated with a better cancer vaccine efficacy.²⁹ Therefore, the immune response polarization was evaluated by ELISA measurement, in the supernatant of splenocyte cultures, of hallmark cytokines for different Th cells subsets: IFN- γ (Th1 response), IL-5 and IL-13 (Th2 response) and IL-17 (Th17 response). In a similar way to the ELISpot assay, we observed a strong IFN- γ production in spleen supernatants from mice treated with TLR4 liposomes, incubated in presence of E7 peptide (**Fig. 2B**) or TC-1 tumor cells (**Fig. S2**). This potent Th1 immune response was associated with a lack of IL-5, IL-13 and IL-17 cytokines within this treatment group. The same tendency was observed for TLR2/6 and NOD1 liposomes, which also promoted IFN- γ production, although at a lower amount. Thus, the vaccine efficacy in our model is correlated with a significant production of IFN- γ , reflecting Th1 polarization of the immune system. These results confirmed the superiority of TLR4 liposomes, which triggered a potent antitumor immunity (**Fig. 2**) in line with the significant tumor regression and improved mice survival (**Fig. 1**).

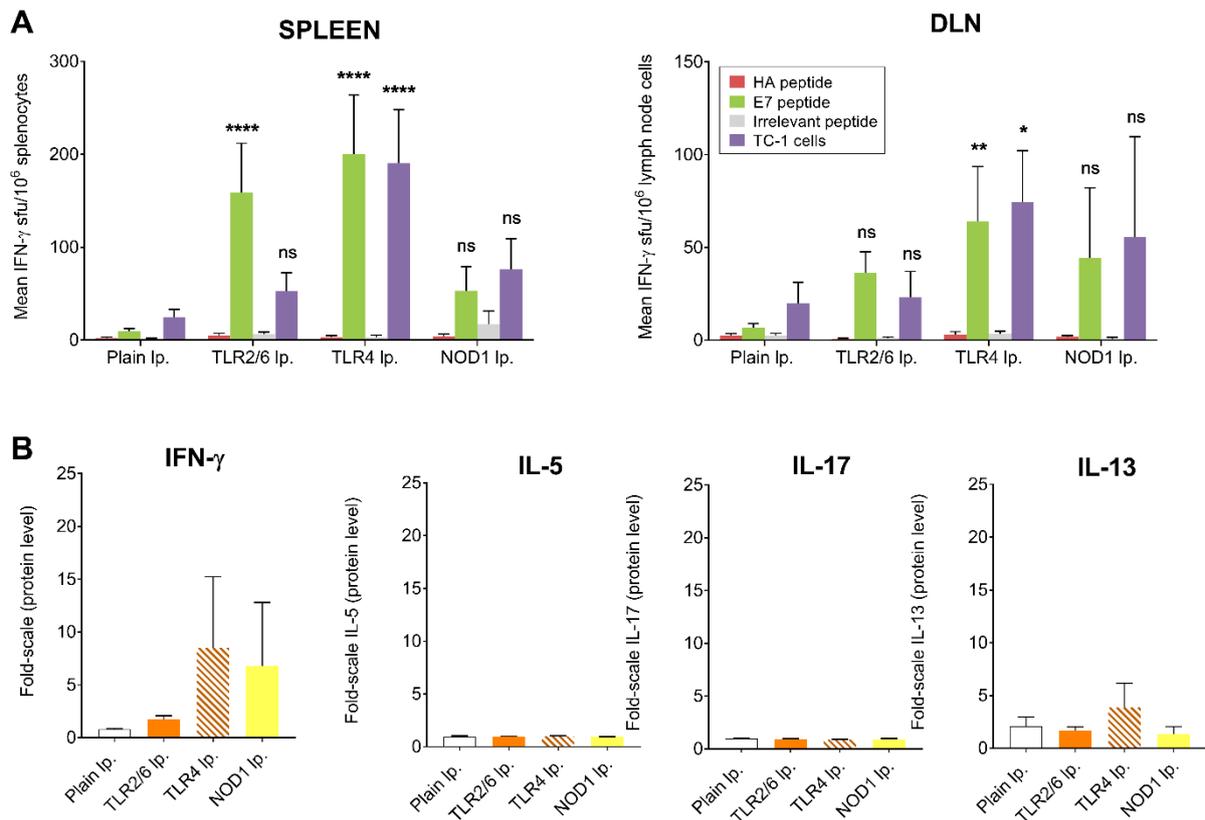


Figure 2. Monitoring of the antitumor immunity.

(A) Evaluation of adaptive cellular immune response after therapeutic vaccination. Following the classic schedule (vaccination at days 2/4), mice were treated with plain liposomes (negative control, n=11) or liposomal constructs containing TLR2/6 (n=8), TLR4 (n=5), or NOD1 (n=4) agonists as adjuvants. At day 28, spleen and DLNs were collected and pooled according to treatment groups. The number of IFN- γ producing cells was measured by ELISpot after 24 h in presence of HA, E7, irrelevant peptides (10 μ g/mL) or 125.103 TC-1 tumor cells. Results are expressed as mean \pm SEM of IFN- γ spots/10⁶ cells. **(B) Cytokines production by splenocytes in response to E7 peptide.** ELISA for IFN- γ , IL-5, IL-17 and IL-13 cytokines were performed after 72 h culture period in presence of E7 peptide, on splenocytes supernatants from mice treated with different vaccine candidates (n=3). Cells incubated in medium alone were used to calculate the relative fold change in cytokine production. “n” represent the number of organ batch from independent experiments. Significant differences were determined by an ANOVA statistical test.

Impact of the depletion of CD8⁺ and CD4⁺ T-cells on the therapeutic effect

In the context of vaccination-induced antitumor immunity, IFN- γ can be produced by CTLs or Th1 cells. Therefore, we investigated the importance of CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in the therapeutic activity of our peptide-based liposomal vaccines. Antibody-mediated depletions of each cell types were performed prior to vaccine and tumor injections, and maintained by a weekly challenge until the end point (**Fig. S3A**). Depletion of CD8⁺ or

CD4⁺ T-cells was confirmed by flow cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC, **Fig. S3B**). Depleted and control mice treated with rat IgG received TC-1 cells *i.v.* injection, followed by two therapeutic administrations of liposomal candidates at days 2 and 4. As expected, treatments with the three peptide-based vaccines induced a significant tumor regression in IgG-treated mice, which was abolished in CD8⁺ T cell-depleted mice (**Fig. 3A**). This decrease of therapeutic efficacy was consistent with a clear reduction of tumor-specific IFN- γ -producing T-cells in the spleen and lymph nodes, in response to E7 peptide (**Fig. 3C, D**) and TC-1 tumor cells (**Fig. S4**). In contrast, CD4⁺ T-cell depletion improved vaccine efficacy, as shown by the decreased number of lung tumor

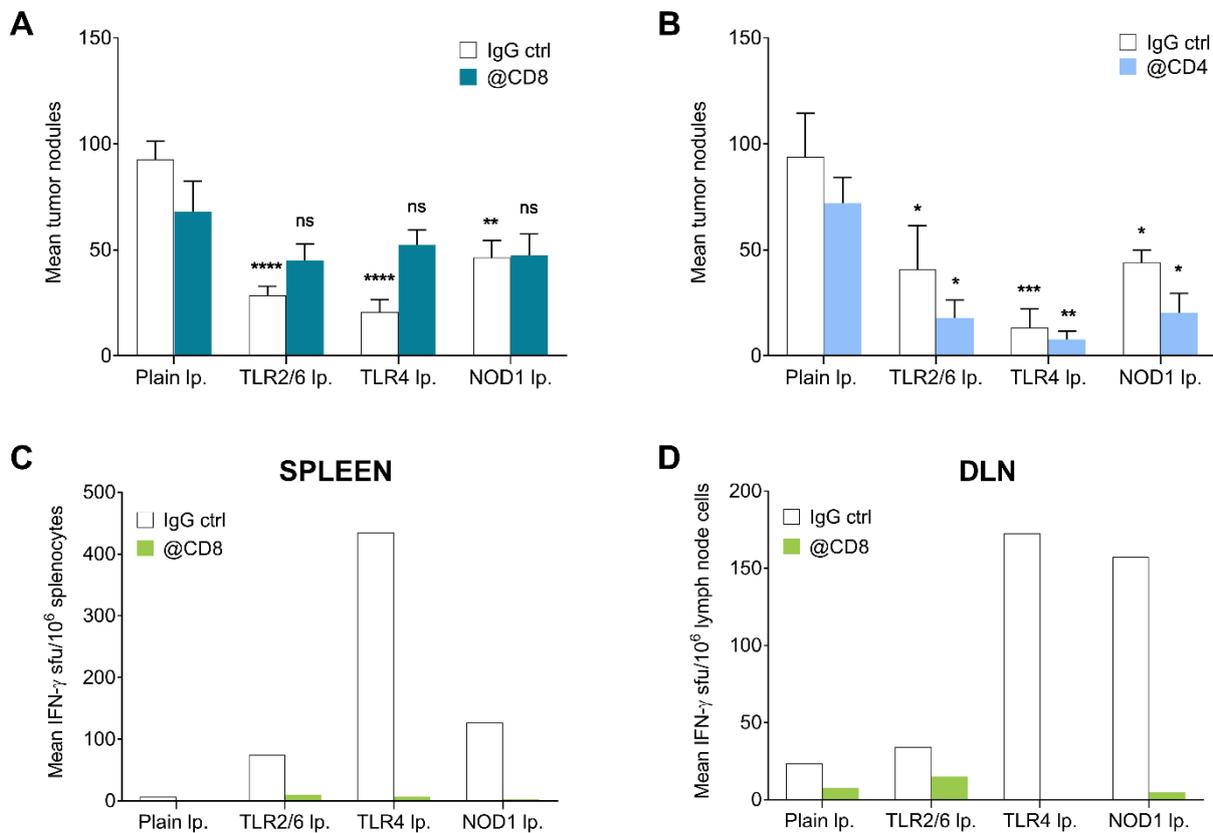


Figure 3. CD8⁺ and CD4⁺ depletion impact on peptide-based vaccines efficacy.

Prior to tumor injection and vaccination (classic schedule), mice received *i.p.* injection of 200 μ g rat IgG (negative control), anti-CD4 or anti-CD8 α depleting antibodies, followed by a weekly challenge to maintained depletion. **(A-B) Antitumor efficacy after T-cell depletion.** At day 28, mice lungs from CD8 α (A) or CD4 (B) depleting experiments were collected, contrasted by intratracheal injection of 15% india ink and decolorated in a Fekete solution overnight. Data represent mean \pm SEM of tumor nodules count, $n=8$ or $n=4$, respectively. Statistically differences between groups were determined using a two-way ANOVA. **(C-D) Inhibition of specific immune response after CD8⁺ depletion (ELISpot in response to E7 peptide).** At day 28, spleen (C) and DLNs (D) from mice treated with rat IgG or CD8 α antibodies were collected and pooled according to treatment groups. The number of IFN- γ producing cells was measured by ELISpot after 24 h in presence of E7 peptide (10 μ g/mL). Results are expressed as mean \pm SEM of IFN- γ spots/10⁶ cells ($n>3$, representing the number of organ batches from independent experiments).

nodules in comparison with their rat IgG-treated counterparts (**Fig. 3B**). This effect is most likely linked to the simultaneous depletion of CD4⁺ T helper and Treg cells, which relieved the tumor microenvironment from one of his major suppressive mechanism. Thanks to the depletion experiments, we demonstrated the importance of CD8⁺ T-cells for our vaccines efficacy, which acted at least partially by inducing the proliferation of tumor-specific CTLs.

Activation and migration of skin DCs into the lymph nodes

In order to induce a potent T-cell differentiation, antigen-loaded skin DCs should become mature and migrate into DLNs after the encounter with adjuvanted-vaccines injected subcutaneously. Ideally, these antigen-presenting cells should be able to perform cross-presentation of E7 peptide into MHC-I molecules. Dermal cDC1 (CD103⁺ Langerin⁺) and CD8 α ⁺ LN-resident DCs were described as the most efficient cross-presenting DCs.^{18,21} Although other skin DC subsets, including epidermal LCs and cDC2 subset, might show potency under certain maturation conditions.^{19–21}

For these reasons, we characterized skin-derived and LN-resident DC subsets in DLN following liposomal vaccination. We quantified the migration of DCs from the skin by assessing their frequency inside DLNs and the activation status of all subsets by measuring their expression of the maturation marker CD86. DLNs were harvested 48 h after a single s.c. injection of the different constructs and the percentage of four DC subsets was subsequently examined by flow cytometry (**Fig. 4**, using the gating strategy in **Fig. S5**). Cholera toxin was used as positive control in our experiment, since it induces potent dermal DC activation and migration.³⁰ Two days after vaccine injection, we observed the migration and maturation of skin DCs into the DLNs by comparing them to the negative control group (plain liposomes). We did not observe any variation of lymph-node residing DCs, in particular CD8 α ⁺ DCs, in term of frequency or CD86 surface expression. TLR4 liposomes were the only vaccine able to induce a strong migration of Langerin/CD207⁻ CD103⁻ cDC2 into the DLN, which was similar to positive control group treated with cholera toxin (**Fig. 4A**). Surprisingly, CD86 expression of migratory cDC2 after TLR4 liposome injection was not significantly affected (**Fig. 4B, C**). These results indicate that the adjuvants in our constructs should preferentially act by increasing the number of migratory, potentially antigen-loaded DCs from the skin, rather than boosting the maturation status of migratory or resident DCs. Interestingly, the least potent vaccine candidate, TLR2/6 liposomes, did not modify the frequency of migratory DCs (**Fig. 4A**), yet triggered a strong

activation of dermal cDC1 and cDC2 (**Fig. 4B, C**). NOD1 liposomes had no significant impact on the migration or activation of DCs, and Langerhans cells appeared unaffected by vaccination with either vaccines.

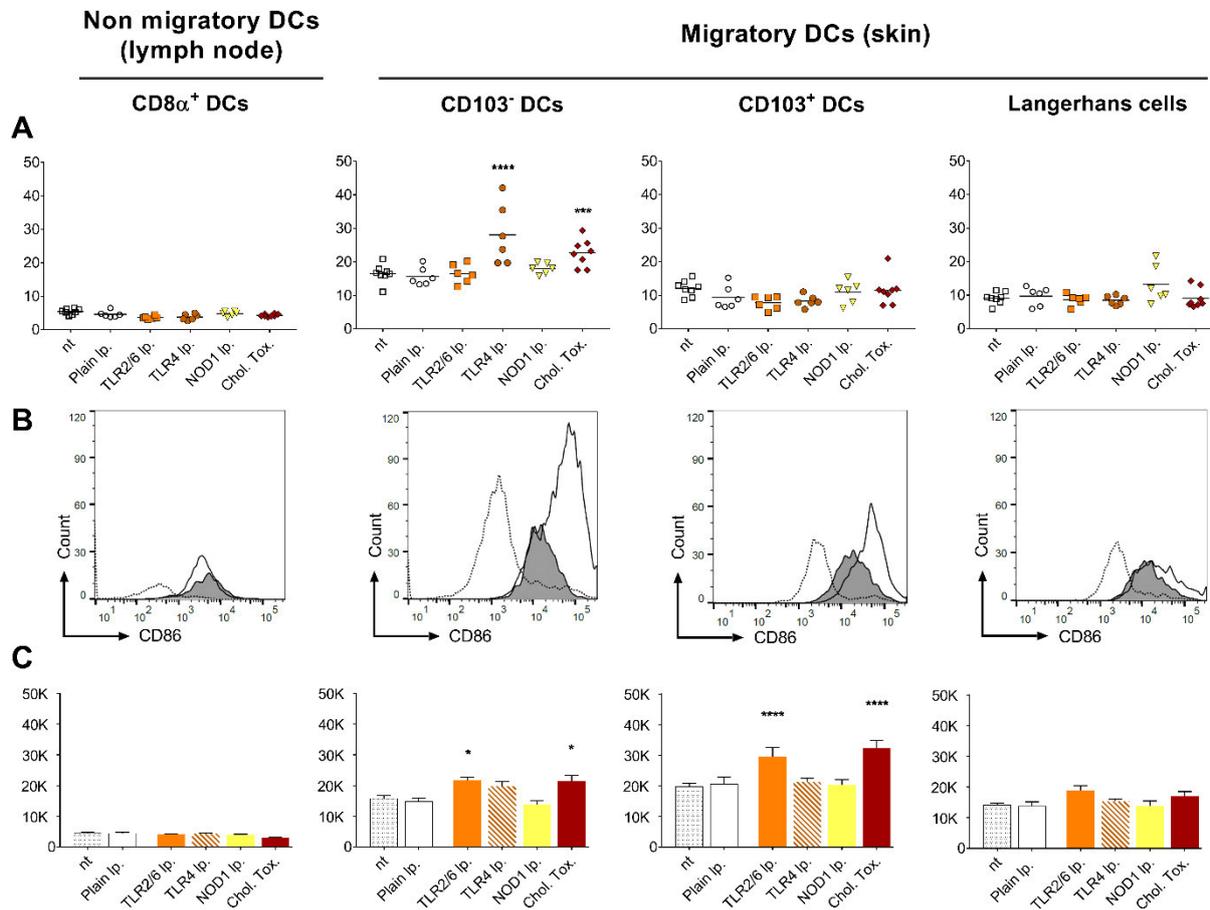


Figure 4. Migration and activation of skin DCs after peptide-based vaccines s.c. injection.

Tumor-free C57BL/6J mice were left untreated (nt) or received a s.c. injection of plain liposomes, TLR2/6 liposomes, TLR4 liposomes, NOD1 liposomes or cholera toxin (Chol. Tox.) into their right flank. Flow cytometric analysis of DLN resident or migratory DC subsets were performed 48 h after immunization. Gating strategy for CD8 α ⁺, CD103⁻, CD103⁺ and Langerhans DCs are shown in Fig. S5. **(A) Frequency of DC subsets among CD11c⁺ cells.** Each data point represents measurement obtained in 6-8 mice from two independent experiments. **(B) Representative comparison of CD86 expression** from an untreated mouse (shaded histograms), a mouse treated with Chol. Tox. (empty histograms with solid lines) and FMO control (histograms with dotted lines). **(C) Mean fluorescence intensity of CD86** surface density on four different DC subsets, from 5 treatment groups. Data are the mean \pm SEM of two independent experiments, with at least 3 mice per condition. Significant differences were determined by a 2-way ANOVA statistical test.

Discussion

Taking advantage of a liposomal platform created by our laboratory, we recently defined the optimized epitope composition and adjuvant doses of three peptide-based antitumor vaccines, which differed only by their adjuvant composition (**Chapitre 1**). The hereby report sought to evaluate the therapeutic activity of these constructs in a preclinical model of HPV-transformed tumors, and to gain more insight into their immunological mode of action by evaluating *in vivo* the immune response polarization and the immune cells involved in this response. For this, we studied the role of CD4⁺ and CD8⁺ cells but also the DC subsets that are affected by the three peptide-based vaccines. Indeed, DCs subsets express different Toll-like or Nod-like receptors, depending on their origin or phenotype, and may then react differently in presence of various vaccine compositions.^{31,32}

Among the three vaccine candidates we evaluated, MPLA containing-liposomes (TLR4 agonist) were undoubtedly the most effective treatment against TC-1 orthotopic pulmonary model. This vaccine was able to significantly reduce the tumor growth, when administered up to 2 weeks after tumor cells injection. This is an impressive result given the fact that pulmonary nodules were detectable 8 days after TC-1 cells i.v. injection and that the rapid growth of this cell line lead to the death of untreated mice around day 30. TLR4 liposomes induced a long-lasting antitumor activity associated with a better survival of mice, which was strikingly more effective when injected at a later stage of cancer (**Fig. 1E**). We assumed that the efficacy of our vaccine was improved by the presence of growing tumor nodules, which may have magnified the antitumor immune response, as an antigen source and pro-inflammatory inducer. Indeed, it was already shown that immune checkpoint inhibitors^{3,33} or vaccines^{34,35} had a greater therapeutic efficacy before tumor surgery, in preclinical and clinical studies.

TLR4 liposomes triggered the induction of a systemic and local Th1 immune, associated with a unique production of IFN- γ by immune cells, observed in cell supernatants as well as in ELISpot assay. As expected, depletion of CD8⁺ T-cells drastically decreased the antitumoral immune response, whereas depletions of CD4⁺ T-cells did not. At first, this observation was very surprising given the absolute requirement of CD4⁺ Th1 cells for the maturation of CD8⁺ cytotoxic T-cells. Nevertheless, the depletion of CD4⁺ cells could have affect the CD4⁺ Foxp3⁺ subset (Treg) responsible for the suppression of CD8⁺ T-cells maturation and proliferation.^{36,37} The decrease in Treg cells triggered in our depletion

experiment might have induced the conversion of “cold” to “hot” tumors, hence helper T-cells were no longer mandatory for CTLs to reduce the tumor growth.³⁸

HPV-transformed tumors such as cervical cancer and non-small-cell lung cancer (NSCLC) are amongst the deadliest cancer in the world. HPV oncogene protein E7 is responsible for the induction of cellular transformation and its expression by tumor cells provide a unique antigen, which can be targeted by cancer vaccines. This study was performed on a E7-transformed cell line derived from mice pulmonary epithelial cells, the TC-1 cell line, which had proven to be an accurate preclinical model for the prediction of human vaccines efficacy.^{39,40} Various E7 antigen-based vaccines were already assessed against subcutaneous or orthotopic pulmonary TC-1 tumors such as recombinant virus,^{41–45} Shiga toxin B-subunit protein fusion,⁴⁶ dendritic cells,^{47,48} mRNA or DNA vaccine,^{49–51} syngeneic cells,⁵² whole protein with complete Freund's adjuvant,^{53,54} and synthetic long peptides.⁵⁵ Most of these studies presented a great efficacy within prophylactic and challenge experiments. However, we are not aware of any published studies involving E7-based vaccines, which showed a good therapeutic effect and long-lasting antitumor activity in primary tumor-bearing mice, such as the TLR4 liposomes.

The Pam₂CAG, used as TLR2/6 agonist, was the least effective adjuvant against TC-1 orthotopic lung tumors. However, in our previous studies using an ectopic model of s.c. implanted RenCa cells, TLR2/6 liposomes have shown a certain efficacy during early stages of tumor progression.^{23,24} Regarding the literature, TLR2 targeting formulations were rarely used in therapeutic vaccination, since the CD4⁺ T-cell polarization triggered by TLR2 activation differs between agonists and mice strains. The same TLR2 agonist had been reported by several studies to induce either Th2, Th1, or Th17 polarization.⁵⁶

The most puzzling effect was observed with NOD1 liposomes, which were able to significantly reduce the tumor growth during the first month after TC-1 injection, but failed to increase mice-bearing tumor survival, even when injected at days 2-4. Given these observations, NOD1 liposomes seemed to induce a transient antitumor effect but did not induce a long-term memory immune response. This hypothesis was confirmed by the immune monitoring of NOD1 liposomes-treated mice which did not have a significant number of IFN- γ producing T-cells specific of the E7 peptide, compared to the control. Likewise, CD8-depleted mice treated with NOD1 liposomes presented the same number of tumor nodules than IgG-treated counterpart (**Fig. 3A**). Then, we postulated that NOD1 liposomes may act *via* the activation of innate lymphoid subsets, as it was already shown that NKT and NK cells express NOD1. Their stimulation with NOD1 agonist induced a

strong IFN- γ production and enhanced their cytotoxic activity.^{57,58} Accordingly, the amount of IFN- γ detected in cell supernatant (but not in ELISpot Assay) could have been produced by innate lymphoid subsets such as NK, NKT or $\gamma\delta$ T-cells.⁵⁹ However, the stimulation of innate subsets did not seem to be efficient enough in this model, as it seemed that a strong and specific antitumor immunity is essential for the vaccination therapeutic effect.

Two studies have shown that the co-stimulation of NOD1 and TLR2 could induce a synergistic effect on the induction of a cytotoxic immune response by targeting NKT cells⁵⁷ or DC⁶⁰ in the context of bacterial infections. In this respect, our liposomal platform could be used to combine inside of the same nanoparticle NOD1 and TLR2 agonists and assess their simultaneous administration as vaccinal adjuvants for cancer therapy, which may have the potential to stimulate both innate and adaptive immunity.

The differences in the efficiency of the three peptide-based liposomal vaccines could be explained by the ways in which these constructs interact with the DCs. NOD1 liposomes did not impact neither the migration nor the activation of DCs, which corroborate the hypothesis that it act independently of an adaptive cytotoxic immune response. Surprisingly, the least effective vaccine containing the TLR2/6 agonist induced the strongest maturation of skin DCs subsets (CD103⁻ and CD103⁺ DCs), known to be involved in the cross-presentation of tumor antigens.^{21,61} No migration was measured with TLR2/6 liposomes, thus we postulated that this treatment targeted directly the migratory DCs into the lymph nodes. Indeed, it was already shown that liposomes are efficiently drained by the lymphatic system after s.c. administration.²⁷ In contrary, TLR4 liposomes did not affect the maturation of DCs, at the time when analysis were performed, but induced an impressive migration of CD103⁻ DCs originated from the dermal tissue. Therefore, it seems that peptide-based liposomal vaccines efficacy should be correlated to an increase of the number of migratory DCs from the skin, rather than an activation of migratory or resident DCs.

The type of platform used in this studies can overcome major drawbacks in the development of potent vaccines by enabling: i) the selection of specific antigens, ii) the optimization of adjuvants composition and iii) the evaluation of antigen-adjuvant association, necessary to avoid unspecific immune responses or inefficient T helper polarization.⁶² More importantly, this study highlights the need to study adjuvant mechanism and identify immune features required to benefit from one type of vaccination composition. Thanks to this approach, we selected the TLR4 liposomes as the best vaccines against an HPV-transformed tumor model, containing the E7 tumor peptide, an

universal T helper epitope and MPLA, the TLR4 agonist within liposomal nanoparticles. A tunable vaccination platform is an innovative tool to facilitate vaccine manufacturing, but may also ultimately be of interest for the conception of personalized medicines. A vaccine containing a universal helper peptide and a strong adjuvant could be the core of preformed personalized drugs, which will be associated at the bedside to neoantigenic peptides sequenced from patient biopsies.^{62–64}

Material and Methods

Formulation and characterization of liposomal constructs

Protocols for liposomal formulation and characterization are presented in **Supplementary Methods**, and were based on our previous publications.^{24,65}

Peptides and agonists

Synthetic peptides were obtained from Genosphere Biotechnologies. The influenza virus haemagglutinin-derived peptide, HA 307–319 (PKYVKQNTLKLAT-C), refers to CD4 epitope. The peptide derived from HPV16 oncogene protein, E7 49-57 (RAHYNIVTF-C), refers to CD8 epitope. MART 27-35 (AAGIGILTV) is an irrelevant peptide for this tumor model and was used as negative control during ELISpot assay. The lipopeptide S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-(R)-cysteinyl-alanyl-glycine (Pam₂CAG, TLR2/6 agonist) was synthesized in the laboratory as previously described.⁶⁶ The lipopolysaccharide derivative monophosphoryl lipid A (MPLA, TLR4 agonist) and the acylated derivative of the dipeptide γ -D-Glu-mDAP (C12iEDAP, NOD1 agonist) were purchased from Invivogen (San Diego, CA).

Animals

Specific-pathogen-free 6-8 week old male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories. *In vivo* experiments were performed in full compliance with the CEE directive 2010/63/EU adopted on 22 September 2010, relating to the protection of animals used for experimental purposes and was done in compliance with the French law (décret n° 2013–118, 1 February 2013). Experiments were performed with the approval of the local Animal Care and Use Committee of Alsace (authorization number: APAFiS #10825-2017073117337272).

Tumor cell line

All the reagents use for cell culture were purchased from Sigma-Aldrich. TC-1 cells, expressing E7 protein from HPV16, were obtained from ATCC® (CRL-2785™). TC-1 cell line was derived from pulmonary epithelial cells of C57BL/6J mice, immortalized by

transduction of the LXS_{N16E6E7} retroviral vector and subsequently transformed with the pVEJB plasmid expressing activated human c-Ha-*ras* gene.⁶⁷ Cells were cultivated in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and were incubated at 37 °C in 5% CO₂, 80% humidity.

In vivo evaluation of liposome-based vaccines

A total of 1×10^5 TC-1 cells were injected intravenously in the tail vein of C57BL/6J mice in 100 µL normal saline solution, except for DC subsets analysis, which was performed on tumor-free mice. In each experiment, mice received two s.c. immunizations in the right flank at 2-days interval. Treatments with liposomal vaccines contained 15 µg E7 peptide or an equivalent amount of lipids (~1 mg) for plain liposomes (negative control). The interval between tumor injection and therapeutic vaccinations varied as specified in each figure legends.

CD4 and CD8α depleting antibodies (clone GK1.5 and 53-6.72 respectively) were purchased from eBioscience. Depletions of CD8⁺ or CD4⁺ cells were performed by a single i.p. injection of 200 µg depleting antibodies one day before tumor implantation, followed by a weekly recall injection. Purified IgG from rat serum (Sigma) was injected into control mice. Blood was sampled from the submandibular vein of the cheek pouch with a 5-mm lancet to monitor the depletion of CD8⁺ or CD4⁺ T-cells at day -3, 7, 14 and 21 by flow cytometry analysis of PBMC (see **Supplementary Methods**).

Mice bearing tumors were euthanized at day 28 after tumor injection (except for survival experiments) or whenever they showed signs of pain and discomfort. After the sacrifice, spleen, lymph nodes draining the site of injection and lungs were harvested for the evaluation of antitumor immunity or tumor growth progression. Mice lungs were contrasted by intratracheal injection of 15% India Ink solution, followed by bleaching into a Fekete's solution. For each mouse, the number of white tumor nodules on the black surface of lungs was counted using a magnifier lamp.

For DC subsets migration and activation analysis, negative and positive control groups were added: untreated mice or cholera toxin injection (2 µg/dose, Sigma). Tumor-free C57BL/6J mice received only one treatment injection and 48 h after, inguinal DLN from the right flank were harvested for digestion, labeling and flow cytometry analysis.

Lymph node and spleen cell suspensions

DC subsets analysis: DLN cell suspension was obtained by mechanical disruption, digestion (Collagenase D, DNase I, Roche Applied Science) for 1 h at 37 °C and filtration on 100 µm nylon mesh cell strainer.

ELISpot and ELISA assays: Spleen and lymph nodes draining the injection site (axillary and inguinal) from the same group treatment were pooled, dissociated and filtered onto a 70 µm nylon mesh cell strainer (BD Falcon™). Resulting cell suspensions were centrifuged at 200g for 5 min and lymph node cell pellet was resuspended in RPMI medium, where FCS is replaced with 2% normal mouse serum (Dominique Dutscher). To remove red blood cells, the spleen cell pellet was resuspended in ammonium-chloride-potassium (ACK) lysing buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, and 0.1 mM EDTA, pH 7.4) at room temperature for 30 s. ACK was diluted 10 times in RPMI to stop the lysis, centrifuged and the spleen cell pellet was resuspended in RPMI 2% normal mouse serum. Cells were counted and diluted before used in further *ex vivo* experiments (see protocols below).

IFN-γ ELISpot assay

PVDF membrane 96-well plates (Multiscreen® HTS filter plates, Merck Millipore) were activated with 35% ethanol and coated with purified anti-mouse IFN-γ (clone AN-18, eBioscience) in PBS overnight at 4 °C. After three washes, membranes were blocked with RPMI 10% FCS for at least 2 h at 37 °C, and washed again with RPMI without FCS. Spleen or DLN suspensions were cultured in triplicates (4.10⁶ cells/mL), in presence of recombinant human IL-2 (30 U/ml), with CD4⁺ or CD8⁺ T-cell epitopes (10 µg/mL), irrelevant peptide (10 µg/mL) or TC-1 tumor cells (125.10³ cells/mL). Cells cultured in medium alone or with 1.25 µg/mL of concanavalin-A (Sigma) were used as negative and positive controls, respectively. After 20-24 h at 37 °C, 5% CO₂, plates were washed with PBS 0.01% Tween 20 and immunospots were revealed using consecutive incubations with biotinylated anti-IFN-γ detection antibody (clone R4-6A2, eBioscience), alkaline phosphatase-conjugated extravidin and BCIP/NBT solution (Sigma). Spots were counted using a Bioreader 4000 PRO-S (Biosys, Karben, Germany). The number of spots obtained with the negative control (medium alone) was subtracted from other conditions, normalized per 10⁶ cells and averaged for each triplicate.

ELISA

Cytokine levels in spleen cell supernatants were measured by ELISA, after 72 h incubation in the same conditions as IFN- γ ELISpot assay. IFN- γ , IL-5, IL-13 (eBioscience) and IL-17 (R&D systems) antibody pairs and standard were used at concentrations recommended by manufacturers. Briefly, purified antibodies in a 0.05 M pH9.6 carbonate/bicarbonate buffer were adsorbed on ELISA plates (Microlon™, Greiner Bio-One) overnight at 4 °C, before blocking with PBS 0.05% Tween 20 containing 1% BSA (1 h, 37°C). 50 μ L of supernatants in duplicate were then incubated (2 h, 37 °C), followed by incubations with biotinylated antibodies detection in blocking buffer (1 h, 37 °C). Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin was then added (45 min, 37 °C) and revelation was conducted by adding a solution of 1.25 mM tetramethylbenzidine and 13.05 mM H₂O₂ in 0.1 M pH 5 citrate buffer. After 15 min, enzymatic reaction was stopped by the addition of 1 M HCl and the absorbance was read at 450 nm with a spectrophotometer (Safas SP2000, Xenius 5801, Monaco). Fold change was determined by dividing the amount of cytokine observed under each condition by the one obtained with negative control (medium alone).

Flow cytometry analysis

For DC subsets analysis, anti-Langerin/CD207-AF488 (clone 929F3.01) (Dendritics), anti-CD103-PE (clone M290), anti-CD8 α -PercP/Cy5.5 (clone 53-6.7), anti-CD11c-PE/Cy7 (clone HL3) (BD Pharmingen™), anti-CD86-APC (clone PO3), anti-MHC class II (I-A/I-E)-Alexa700 (clone M5/11415.2) (Biolegend) antibodies were used for flow cytometry at concentrations recommended by manufacturers.

Prior to antibody staining, dead cells were labelled with FVD-eFluor450 (eBioscience) and Fc-receptors were blocked with FcR blocking reagent (Miltenyi Biotech) for 15 min. Cells were then incubated with the staining antibodies during 30 min at 4°C. For cell permeabilization and fixation, the pellets were resuspended in BD Cytofix/Cytoperm™ buffer followed by an internal staining with anti-Langerin-AlexaFluor488 for 30 min at 4 °C. Data were acquired on a Gallios flow cytometer (Beckman-Coulter, Brea, CA) and analysis was performed with Flowjo® software (version 10.2, Ashland, OR).

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM and were calculated with the GraphPad Prism 7.0 software. Statistical differences obtained in the ELISpot assay, depletion experiments and

DC subsets analysis were determined by a two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison *posthoc* test. A One-way Anova was performed for the comparison of tumor count and ELISA protein fold change; a nonparametric test (Kruskal-Wallis) was used instead when recommended. Survival curves were compared with a Log-rank test. Difference between groups was considered statistically significant for $p < 0.05$ (one symbol), $p < 0.01$ (two symbols), $p < 0.001$ (three symbols) or $p < 0.0001$ (four symbols).

Disclosure of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by "Alsace contre le Cancer", the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Strasbourg. Célia Jacobberger-Foissac is a recipient of a PhD grant from the french Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, and from "La Ligue contre le Cancer" (grant number IP-SCG-JD-14779) during the 4th year.

References

1. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480–489. doi:10.1038/nature10673
2. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC medicine*. 2016;14:73. doi:10.1186/s12916-016-0623-5
3. Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, Thatcher N, Wagstaff J, Zielinski C, Faulkner I, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 2014;11(9):509–524. doi:10.1038/nrclinonc.2014.111
4. Wong KK, Li WA, Mooney DJ, Dranoff G. Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. *Advances in Immunology*. 2016;130:191–249. doi:10.1016/bs.ai.2015.12.001
5. Maeng H, Terabe M, Berzofsky JA. Cancer vaccines: translation from mice to human clinical trials. *Current Opinion in Immunology*. 2018;51:111–122. doi:10.1016/j.coi.2018.03.001
6. Slingluff CL. The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination? *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2011;17(5):343–350. doi:10.1097/PPO.0b013e318233e5b2
7. Melssen M, Slingluff CL. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 2017;47:85–92. doi:10.1016/j.coi.2017.07.004
8. Maisonneuve C, Bertholet S, Philpott DJ, De Gregorio E. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(34):12294–12299. doi:10.1073/pnas.1400478111
9. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(1):55–63. doi:10.1080/14760584.2016.1213632
10. Keilholz U, Martus P, Scheibenbogen C. Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(7 Pt 2):2346s-2352s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2540
11. Butterfield LH. Cancer vaccines. *The BMJ*. 2015 [accessed 2018 Apr 4];350. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707521/>. doi:10.1136/bmj.h988
12. Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*. 2011;117(26):7021–7031. doi:10.1182/blood-2010-07-294389
13. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35:S185–S198. (A broad-spectrum integrative design for cancer prevention and therapy). doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.004
14. Duan M-C, Zhong X-N, Liu G-N, Wei J-R. The Treg/Th17 paradigm in lung cancer. *Journal of Immunology Research*. 2014;2014:730380. doi:10.1155/2014/730380
15. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *European Journal of Immunology*. 2004;34(2):336–344. doi:10.1002/eji.200324181

16. Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunology Research*. 2013;1(3):145–149. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0102
17. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews. Immunology*. 2012;12(8):557–569. doi:10.1038/nri3254
18. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(4):823–836. doi:10.1084/jem.20091627
19. Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, Ronchese F, Romani N. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(20):7783–7788. doi:10.1073/pnas.0509307103
20. Flacher V, Tripp CH, Mairhofer DG, Steinman RM, Stoitzner P, Idoyaga J, Romani N. Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(9):1191–1204. doi:10.15252/emmm.201303283
21. Wylie B, Seppanen E, Xiao K, Zemek R, Zanker D, Prato S, Foley B, Hart PH, Kroccek RA, Chen W, et al. Cross-presentation of cutaneous melanoma antigen by migratory XCR1+CD103- and XCR1+CD103+ dendritic cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(8):e1019198. doi:10.1080/2162402X.2015.1019198
22. O'Sullivan D, Arrhenius T, Sidney J, Del Guercio MF, Albertson M, Wall M, Oseroff C, Southwood S, Colón SM, Gaeta FC. On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1991;147(8):2663–2669.
23. Roth A, Rohrbach F, Weth R, Frisch B, Schuber F, Wels WS. Induction of effective and antigen-specific antitumour immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct. *British Journal of Cancer*. 2005;92(8):1421–1429. doi:10.1038/sj.bjc.6602526
24. Thomann J-S, Heurtault B, Weidner S, Brayé M, Beyrath J, Fournel S, Schuber F, Frisch B. Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials*. 2011;32(20):4574–4583. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.015
25. Prabhu PR, Jayalekshmi D, Pillai MR. Lung Cancer and Human Papilloma Viruses (HPVs): Examining the Molecular Evidence. *Journal of Oncology*. 2012 [accessed 2018 Feb 22]. <https://www.hindawi.com/journals/jo/2012/750270/>. doi:10.1155/2012/750270
26. Fan X, Yu K, Wu J, Shao J, Zhu L, Zhang J. Correlation between squamous cell carcinoma of the lung and human papillomavirus infection and the relationship to expression of p53 and p16. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(4):3043–3049. doi:10.1007/s13277-014-2940-7
27. Oussoren C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;50(1):143–156. (Transport and absorption of Drugs Via the Lymphatic System). doi:10.1016/S0169-409X(01)00154-5
28. Kelly C, Jefferies C, Cryan S-A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *Journal of Drug Delivery*. 2011;2011:727241. doi:10.1155/2011/727241
29. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016;164(6):1233–1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049
30. Apte SH, Redmond AM, Groves PL, Schussek S, Pattinson DJ, Doolan DL. Subcutaneous cholera toxin exposure induces potent CD103+ dermal dendritic cell

- activation and migration. *European Journal of Immunology*. 2013;43(10):2707–2717. doi:10.1002/eji.201343475
31. Schreibelt G, Tel J, Slieden KHEWJ, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, Vries IJM de. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(10):1573–1582. doi:10.1007/s00262-010-0833-1
 32. Macri C, Pang ES, Patton T, O’Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2017 Dec 23 [accessed 2018 May 28]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116304347>. doi:10.1016/j.semcdb.2017.12.009
 33. Liu J, Blake SJ, Yong MCR, Harjunpää H, Ngiow SF, Takeda K, Young A, O’Donnell JS, Allen S, Smyth MJ, et al. Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer Discovery*. 2016;6(12):1382–1399. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0577
 34. Fisher SA, Cleaver A, Lakhiani DD, Khong A, Connor T, Wylie B, Lesterhuis WJ, Robinson BW, Lake RA. Neoadjuvant anti-tumor vaccination prior to surgery enhances survival. *Journal of Translational Medicine*. 2014 [accessed 2018 Jul 27];12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156969/>. doi:10.1186/s12967-014-0245-7
 35. Grinshtein N, Bridle B, Wan Y, Bramson JL. Neoadjuvant vaccination provides superior protection against tumor relapse following surgery compared with adjuvant vaccination. *Cancer Research*. 2009;69(9):3979–3985. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3385
 36. Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, Fu Y-X. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(5):779–791. doi:10.1084/jem.20041684
 37. Jing W, Gershan JA, Johnson BD. Depletion of CD4 T cells enhances immunotherapy for neuroblastoma after syngeneic HSCT but compromises development of antitumor immune memory. *Blood*. 2009;113(18):4449–4457. doi:10.1182/blood-2008-11-190827
 38. Haanen JBAG. Converting Cold into Hot Tumors by Combining Immunotherapies. *Cell*. 2017;170(6):1055–1056. doi:10.1016/j.cell.2017.08.031
 39. Trimble PCL, Morrow MP, Kravnyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, Edwards L, Parker RL, Denny L, Giffear M, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet (London, England)*. 2015;386(10008):2078. doi:10.1016/S0140-6736(15)00239-1
 40. Poelgeest MIE van, Welters MJP, Vermeij R, Stynenbosch LFM, Loof NM, Meer DMAB der, Löwik MJG, Hamming ILE, Esch EMG van, Hellebrekers BWJ, et al. Vaccination against Oncoproteins of HPV16 for Noninvasive Vulvar/Vaginal Lesions: Lesion Clearance Is Related to the Strength of the T-Cell Response. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(10):2342–2350. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2594
 41. Liu D-W, Tsao Y-P, Kung JT, Ding Y-A, Sytwu H-K, Xiao X, Chen S-L. Recombinant Adeno-Associated Virus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Peptide DNA Fused with Heat Shock Protein DNA as a Potential Vaccine for Cervical Cancer. *Journal of Virology*. 2000;74(6):2888–2894. doi:10.1128/JVI.74.6.2888-2894.2000
 42. Cheng W-F, Hung C-F, Chai C-Y, Hsu K-F, He L, Ling M, Wu T-C. Enhancement of Sindbis Virus Self-Replicating RNA Vaccine Potency by Linkage of Herpes Simplex Virus Type 1 VP22 Protein to Antigen. *Journal of Virology*. 2001;75(5):2368–2376. doi:10.1128/JVI.75.5.2368-2376.2001

43. Lamikanra A, Pan ZK, Isaacs SN, Wu TC, Paterson Y. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *Journal of Virology*. 2001;75(20):9654–9664. doi:10.1128/JVI.75.20.9654-9664.2001
44. Li J, Sun Y, Garen A. Immunization and immunotherapy for cancers involving infection by a human papillomavirus in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(25):16232–16236. doi:10.1073/pnas.192581299
45. Jindra C, Huber B, Shafti-Keramat S, Wolschek M, Ferko B, Muster T, Brandt S, Kirnbauer R. Attenuated Recombinant Influenza A Virus Expressing HPV16 E6 and E7 as a Novel Therapeutic Vaccine Approach. *PLoS ONE*. 2015 [accessed 2018 May 29];10(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4575162/>. doi:10.1371/journal.pone.0138722
46. Sadraeian M, Khoshnood Mansoorkhani MJ, Mohkam M, Rasoul-Amini S, Hesarakhi M, Ghasemi Y. Prevention and Inhibition of TC-1 Cell Growth in Tumor Bearing Mice by HPV16 E7 Protein in Fusion with Shiga Toxin B-Subunit from shigella dysenteriae. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2013;15(2):176–181.
47. Mikyšková R, Štěpánek I, Indrová M, Bieblová J, Šímová J, Truxová I, Moserová I, Fučíková J, Bartůňková J, Špíšek R, et al. Dendritic cells pulsed with tumor cells killed by high hydrostatic pressure induce strong immune responses and display therapeutic effects both in murine TC-1 and TRAMP-C2 tumors when combined with docetaxel chemotherapy. *International Journal of Oncology*. 2016;48(3):953–964. doi:10.3892/ijo.2015.3314
48. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, Dransart E, Sandoval F, Riquet M, Rance B, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nature Communications*. 2017;8:15221. doi:10.1038/ncomms15221
49. Bialkowski L, Weijnen A van, Jeught KV der, Renmans D, Daszkiewicz L, Heirman C, Stangé G, Breckpot K, Aerts JL, Thielemans K. Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours. *Scientific Reports*. 2016;6:22509. doi:10.1038/srep22509
50. Yang A, Peng S, Farmer E, Zeng Q, Cheng MA, Pang X, Wu T-C, Hung C-F. Enhancing antitumor immunogenicity of HPV16-E7 DNA vaccine by fusing DNA encoding E7-antigenic peptide to DNA encoding capsid protein L1 of Bovine papillomavirus. *Cell & Bioscience*. 2017 [accessed 2018 May 29];7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5569540/>. doi:10.1186/s13578-017-0171-5
51. Wu C-C, Wu F-C, Hsu Y-T, Hsiao Y-C, Yang Y-C, Chang CA, Chang C-L. Enhanced anti-tumor therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusing the E7 gene to BAFF in treating human papillomavirus-associated cancer. *Oncotarget*. 2017;8(20):33024–33036. doi:10.18632/oncotarget.16032
52. Chen I-J, Yen C-F, Lin K-J, Lee C-L, Soong Y-K, Lai C-H, Lin C-T. Vaccination with OK-432 followed by TC-1 tumor lysate leads to significant antitumor effects. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*. 2011;18(7):687–694. doi:10.1177/19337191110396230
53. Li Y-L, Qiu X-H, Shen C, Liu J-N, Zhang J. Vaccination of full-length HPV16 E6 or E7 protein inhibits the growth of HPV16 associated tumors. *Oncology Reports*. 2010;24(5):1323–1329. doi:10.3892/or_00000989
54. LI Y-L, MA Z-L, ZHAO Y, ZHANG J. Immunization with mutant HPV16 E7 protein inhibits the growth of TC-1 cells in tumor-bearing mice. *Oncology Letters*. 2015;9(4):1851–1856. doi:10.3892/ol.2015.2911

55. Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJM. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2002;169(1):350–358.
56. Basto AP, Leitão A. Targeting TLR2 for Vaccine Development. *Journal of Immunology Research*. 2014 [accessed 2018 Jul 29];2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4098989/>. doi:10.1155/2014/619410
57. Selvanantham T, Escalante NK, Cruz Tleugabulova M, Fiévé S, Girardin SE, Philpott DJ, Mallevaey T. Nod1 and Nod2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2013;191(11):5646–5654. doi:10.4049/jimmunol.1301412
58. Qiu F, Maniar A, Quevedo Diaz M, Chapoval AI, Medvedev AE. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immunity*. 2011;17(4):375–387. doi:10.1177/1753425910372000
59. Pluhar GE, Pennell CA, Olin MR. CD8+ T Cell-Independent Immune-Mediated Mechanisms of Anti-Tumor Activity. *Critical Reviews in Immunology*. 2015;35(2):153–172.
60. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, Collins C, Viala J, Ferrero RL, Girardin SE, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007;26(4):445–459. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.009
61. del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Förster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2007;178(11):6861–6866.
62. Gouttefangeas C, Rammensee H-G. Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2018 Apr 11:1–8. doi:10.1007/s00262-018-2158-4
63. Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science*. 2018;359(6382):1355–1360. doi:10.1126/science.aar7112
64. Charlton Hume HK, Lua LHL. Platform technologies for modern vaccine manufacturing. *Vaccine*. 2017;35(35 Pt A):4480–4485. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.069
65. Kakhi Z, Frisch B, Heurtault B, Pons F. Liposomal constructs for antitumoral vaccination by the nasal route. *Biochimie*. 2016;130:14–22. doi:10.1016/j.biochi.2016.07.003
66. Heurtault B, Gentine P, Thomann J-S, Baehr C, Frisch B, Pons F. Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(2):276–285. doi:10.1007/s11095-008-9724-y
67. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research*. 1996;56(1):21–26

Supplementary figures

Table S1. Composition of formulated liposomes

Liposomal construct	Lipid bilayer		Peptides	
	Composition	Molar ratio	Composition	Molar ratio
Plain lp.	PC/PG/Chol	54/13/33	HA/E7	
TLR2/6 lp. (HA-E7-Pam ₂ CAG)	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	50.9/13/33/3/0.1	HA/E7	0.75/0.75
TLR4 lp. (HA-E7-MPLA)	PC/PG/Chol/DPGmal/MPLA	51/13/33/3/0.007	HA/E7	
NOD1 lp. (HA-E7-C12iEDAP)	PC/PG/Chol/DPGmal/C12iEDA P	50.8/13/33/3/0.3	HA/E7	

PC: phosphatidylcholine, PG: phosphatidylglycerol, Chol: cholesterol, DPGmal: dipalmitoyl glycerol-maleimide, Pam₂CAG: dipalmitoyl-cysteine-alanyl-glycine, MPLA: monophosphoryl lipid A, C12iEDAP: acylated derivative of the dipeptide γ -D-Glu-mDAP.

Table S2. Physicochemical properties of liposome-based constructs. Results are the mean of at least 8 independent formulations (with 3 consecutive measurements in each preparation). Measurements were performed after thawing at room temperature.

Vaccine constructs	Size		Zeta potential (mV)	Peptide coupling rate (%)	Adjuvant (dose/injection) [*]	E7 peptide (dose/injection)
	Average diameter (nm)	PDI				
Plain lp.	70±13	0.187	-60±8	-	-	-
TLR2/6 lp.	76±14	0.236	-51±6	78	2.4 µg	15 µg
TLR4 lp.	89±20	0.215	-63±6	80	0.2 µg	
NOD1 lp.	83±16	0.216	-61±6	83	2.2 µg	

PDI: polydispersity index

^{*}The amount of adjuvants differed since their optimal dosage was already determined in a previous publication (**Chapitre 1**)

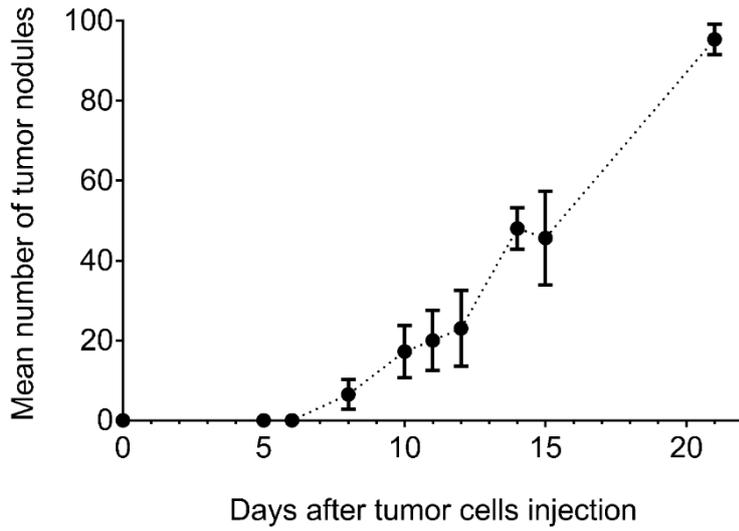


Figure S1. Progression of tumor nodule number after i.v. injection of TC-1 cells. Mice received an i.v. injection of $1 \cdot 10^5$ TC-1 cells and were sacrificed at different times after injection. Lungs were harvested and contrasted for tumor counting. Data represent the mean \pm SEM (n=3).

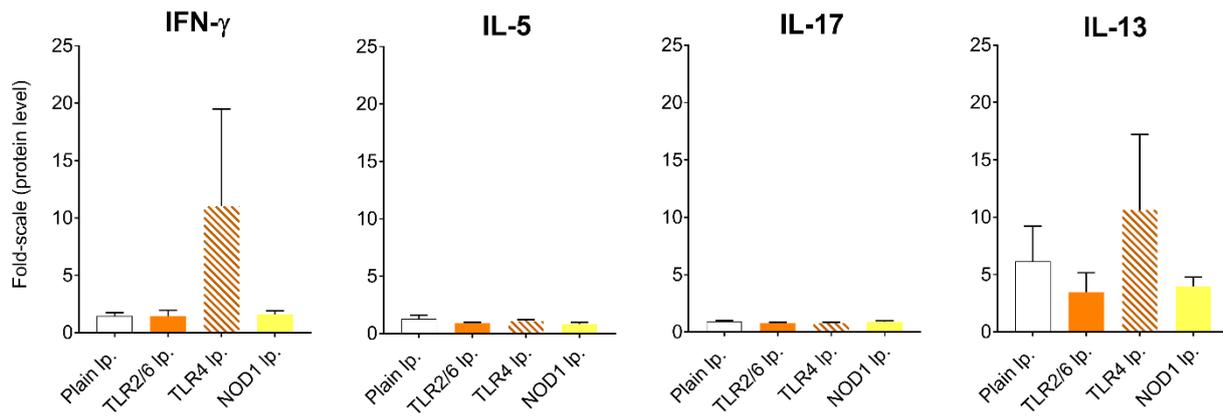


Figure S2. Cytokines production by splenocytes in response to TC-1 cells. ELISA for IFN- γ , IL-5, IL-17 and IL-13 cytokines were performed after 72 h culture period in presence of TC-1 cells, on spleen supernatants from mice treated with different vaccine candidates (n=3). Cells incubated in medium alone were used to calculate the relative fold change in cytokine production.

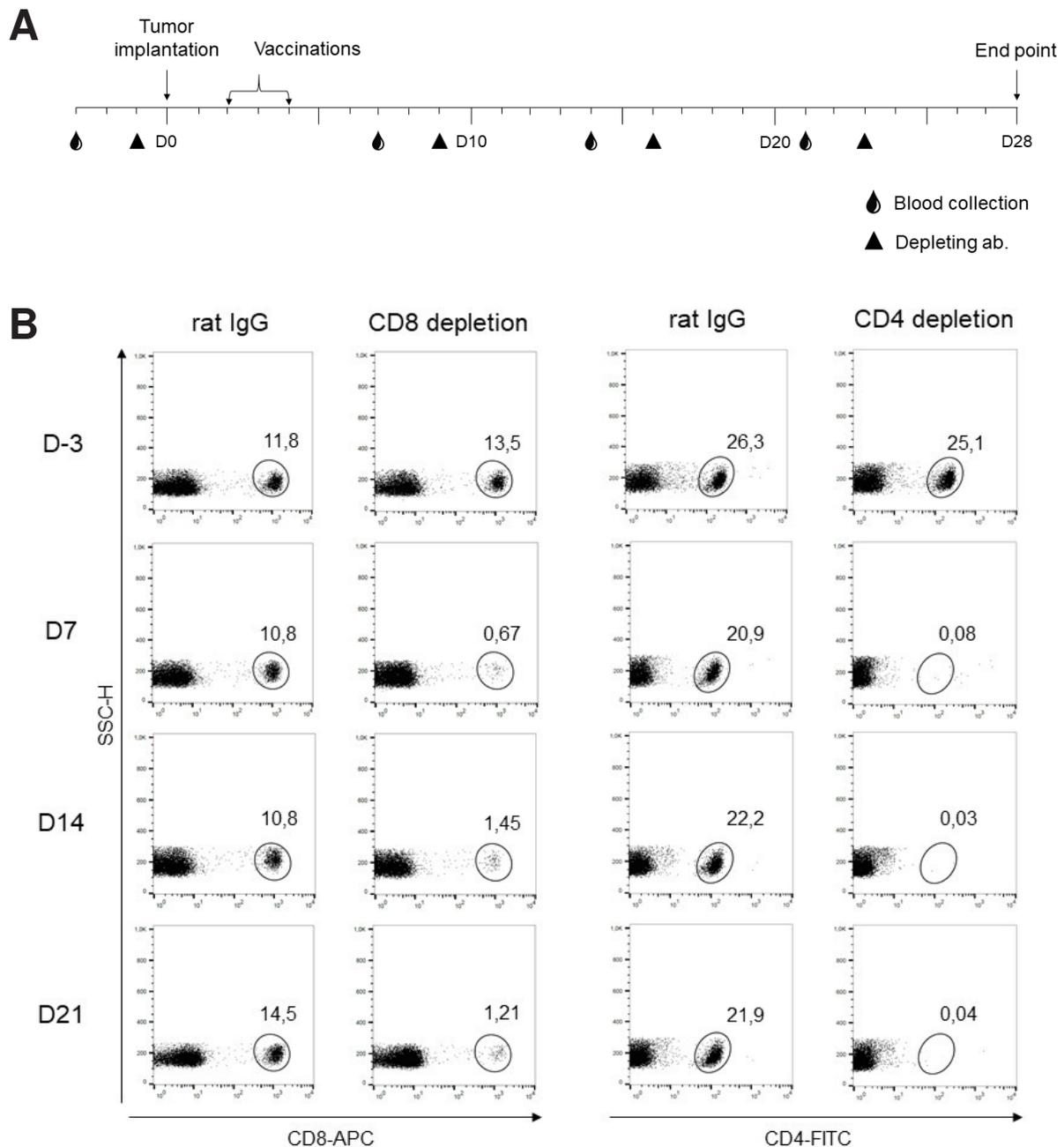


Figure S3. Confirmation of T lymphocyte depletions using flow cytometry analysis of PBMC. (A) Injection and blood collection schedule. Blood samples from the submandibular vein of the cheek pouch were collected at different times in mice treated with i.p injection of rat IgG, anti-CD4 or anti-CD8 α depleting antibodies. **(B) Monitoring of depletion by flow cytometry.** PBMC suspensions were prepared from blood samples and stained with FITC-anti-CD4 or APC-anti-CD8.2 antibodies. Results are shown on dot plots with a logarithmic scale, the percentage of positive cells is given in each dot plot.

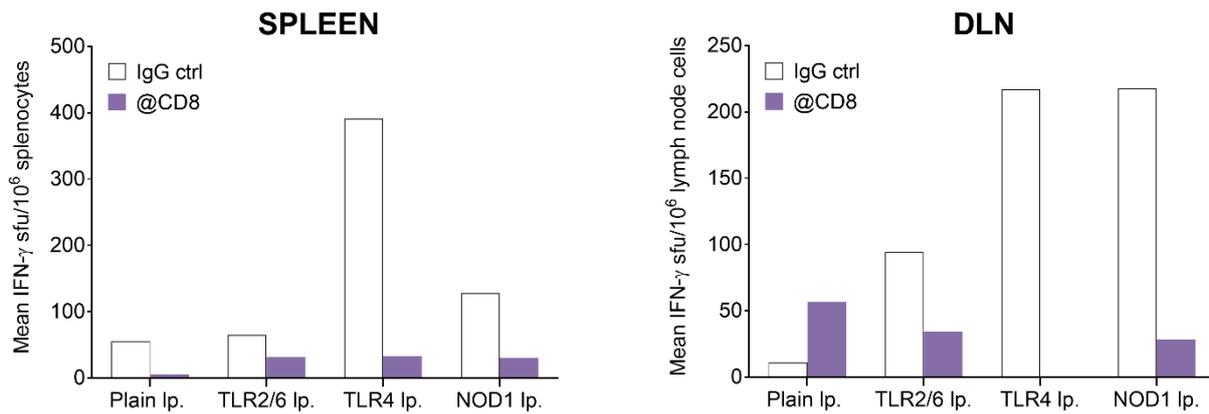


Figure S4. Inhibition of specific immune response after CD8⁺ depletion (ELISpot in response to TC-1 cells). Prior to tumor injection and vaccination (classic schedule), mice received i.p. injection of 200 μ g rat IgG, or anti-CD8 α depleting antibodies, followed by a weekly challenge to maintain the depletion. At day 28, spleen (**C**) and DLN (**D**) from mice treated with rat IgG or CD8 antibodies were collected and pooled according to treatment groups. The number of IFN- γ producing cells was measured by ELISpot after 24 h in presence of 125×10^3 TC-1 tumor cells. Results are expressed as mean \pm SEM of IFN- γ spots/ 10^6 cells ($n > 3$).

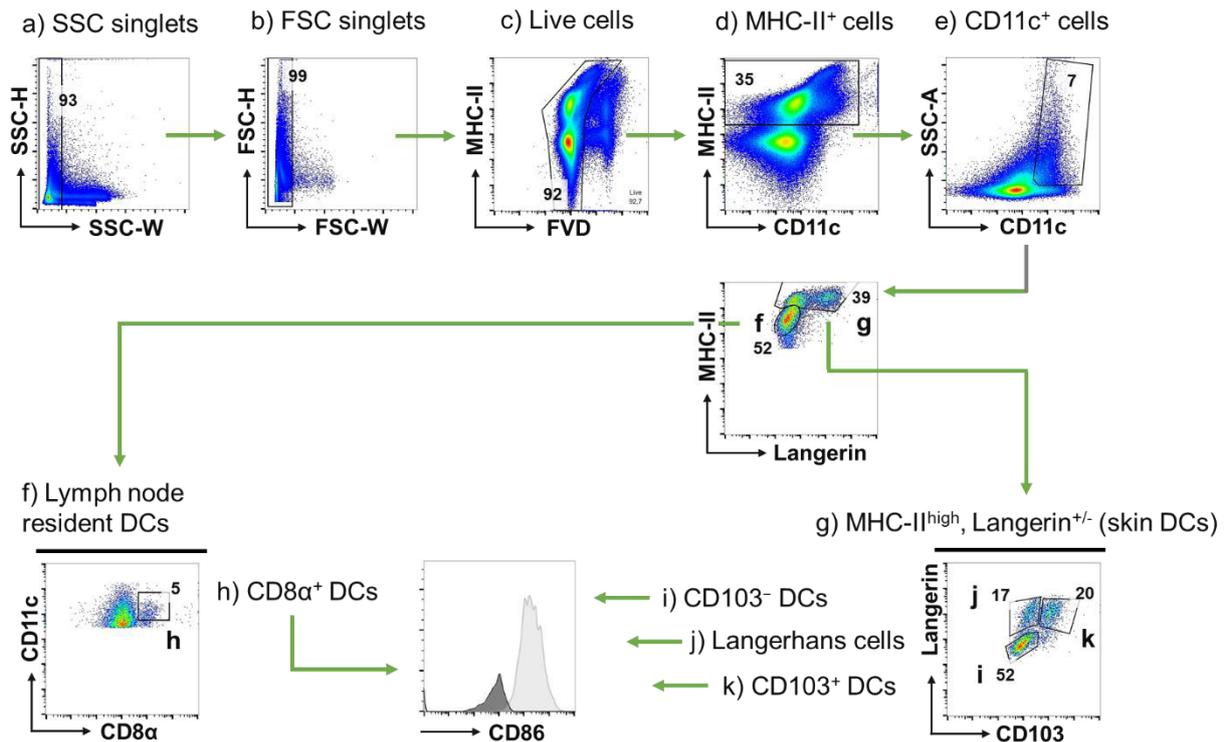


Figure S5. Gating strategy for flow cytometry analysis of DC subsets activation and migration into DLN. Total DLN cells were pre-treated with a viability dye and FcR blocking reagent before being stained with a mixture of antibodies to identify DC subsets (MHC class-II, CD11c, Langerin, CD103, CD8α) and evaluate their activation (CD86).

Among singlets (gate a, b), live cells (gate c) and MHC⁺, CD11c⁺ cells (gates d, e), two populations were separated according to their expression of MHC-II and Langerin. The MHC-II^{mid}, Langerin⁻ population (gate f), representing lymph node resident DCs, was further analyzed for CD8α expression to identify CD8α⁺ resident DCs (gate h). Skin DCs (gate g; MHC-II^{high}, Langerin^{+/-}) were further examined for CD103 and Langerin expression, dividing them into 3 populations: CD103⁻ DCs (gate i; CD103⁻, Langerin⁻), Langerhans cells (gate j; CD103⁻, Langerin⁺) and CD103⁺ DCs (gate k; CD103⁺, Langerin⁺). CD8α⁺ DC, CD103⁻ DCs, Langerhans cells and CD103⁺ DCs were analyzed for their expression of the maturation marker CD86.

Supplementary methods

Formulation of liposomal constructs

Lipids and adjuvants

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC), and cholesterol (Chol, recrystallized in methanol) were purchased from Sigma-Aldrich. Egg yolk L- α -phosphatidyl-*DL*-glycerol (PG) was purchased from Avanti Polar lipids. Lipids purities exceeded 99%. The lipopeptide S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-(R)-cysteinyl-alanyl-glycine (Pam₂CAG) and the thiol-reactive dipalmitoylglycerol-maleimide anchor (DPGmal) were synthesized in the laboratory as previously described.^{1,2} The lipopolysaccharide derivative monophosphoryl lipid A (MPLA) and the acylated derivative of the dipeptide γ -*D*-Glu-mDAP (C12iEDAP) were purchased from Invivogen. All reagents were conserved under argon atmosphere at -20 °C, in a powder form or dissolved in chloroform/methanol (9/1, v/v).

Synthetic peptides

See Material and Methods section in the main publication.

Formulation of peptide-based liposomes

Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by lipid film hydration technique as described previously.³ Briefly, a chloroform/methanol solution (9/1, v/v) containing a mixture of lipids, adjuvant and/or DPGmal anchor were mixed in a round-bottom Pyrex tube, and was completely dried under high vacuum for 45 min. Molar ratios of each component are shown in Table S1. The resulting lipid film was then hydrated in 10 mM Hepes buffer (pH 6.5) containing 5% (w/v) sorbitol at a final phospholipid concentration of 15 mM, leading to the formation of MLV. This suspension was then sonicated (1 s cycle every 3 s) during 1 h at room temperature under a continuous flow of argon, using a Vibra Cell 75041 ultrasonicator (750 W, 20 kHz, Fisher Bioblock Scientific, Waltham, MA) equipped with a 3 mm-diameter tip probe (40% amplitude). The resulting small unilamellar vesicle (SUV) preparations were centrifuged at 13,000 g for 15 min to remove the titanium dust originating from sonication probes.

Peptide conjugation to liposomes

Peptides were first dissolved in milliQ water and potential disulphide bonds were reduced in presence of 0.7 M eq. tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (Sigma) for 15 min under argon at RT. Equimolar quantities of CD4 and CD8 peptide epitopes were then coupled to preformed DPGmal-containing SUV by Michael addition at pH 6.5 (0.5 molar eq. of each peptide compared to surface accessible thiol-reactive maleimide functions). After 4 h under argon at room temperature, a 10-fold excess of β -mercaptoethanol was added for 30 min to inactivate all unreacted maleimide groups on internal and external surface of SUV. Then, the formulation was extensively dialyzed (Spectra/Por, exclusion limit of 12–14 kDa, Spectrum laboratories) against a 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 5% (w/v) sorbitol to eliminate unconjugated peptides and excess of reagents. Finally, 4% glucose (w/v) was added as a cryoprotectant and formulations were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further usage.

Physicochemical characterization of liposomal constructs

Nanoparticle diameter

The average diameter of formulated liposomes was measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern instruments, Orsay, France) with the following specifications: viscosity: 1.014 cP; refractive index: 1.34; scattering angle: 90°; temperature: 25 °C. SUV were diluted at 1/100 in 10 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 5% (w/v) sorbitol, and the results presented are the average of 8 independent formulations (with three consecutive measurements per formulation). Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument. Particle size is expressed in intensity. Samples are considered monodispersed when the polydispersity index (PDI) is < 0.3.

Zeta potential

Zeta potential of liposomes was determined at 25 °C using a Zetasizer Nano-ZS. The samples were dispersed at 1/100 in 10 mM Hepes buffer containing 5% (w/v) sorbitol (pH 7.4) and the zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility based on the Smoluchowski approximation.

Phosphatidylcholine assay

The PC content of formulated liposomes was determined using an enzymatic assay with the LabAssay™ Phospholipid kit (Wako Pure Chemical industries Ltd). Briefly, 1-2 μL of SUV were incubated with 200 μL of the enzymatic reagent in triplicates in a 96-well plate. The reagent contains a phospholipase C that releases the choline, which is then oxidized by the choline oxidase. The reaction produces hydrogen peroxide needed by the peroxidase to convert a chromogen into a blue product. After 10 min at 37 °C, absorbance was measured at $\lambda = 595 \text{ nm}$ using a microplate reader (Safas SP2000, Xenius 5801, Monaco). PC content in each sample was determined from a calibration curve prepared with purified choline chloride.

Peptide assay

The quantification of conjugated peptides in each formulation was performed using fluorescamine (4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dione, Sigma-Aldrich) in a fluorometric assay. Briefly, amino acids were generated during acid hydrolysis of peptide-conjugated liposomes by the addition of 12N HCl, at 110 °C for 12 h in a heating module (Pierce Reacti Therm III™, Thermo Fisher scientific). After neutralization by the addition of 6N sodium hydroxide, 20 μL of the hydrolysis solution was added to 750 μL of 50 mM sodium borate buffer (pH 9), followed by the addition of 250 μL of fluorescamine solution in dioxane (300 mg/L). Fluorescence was measured immediately at $\lambda_{\text{excitation}} = 400 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}} = 480 \text{ nm}$. A physical mixture of plain liposomes and peptides were used to establish a calibration curve. Coupling rates were calculated relative to the quantity of surface-exposed maleimide functions.

Monitoring of CD8⁺ or CD4⁺ depletion by flow cytometry

The efficiency of CD8⁺ or CD4⁺ cells depletion was monitored by flow cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells. Blood samples from the submandibular vein of the cheek pouch of mice were collected into *Capitect* tube (Terumo T-MQK). To remove red blood cells, uncoagulated blood was resuspended in ammonium-chloride-potassium (ACK) lysing buffer (0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , and 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and incubated at room temperature for 10 min. After centrifugation and washing into cold PBS 2% FCS, the white blood cell pellet was incubated with @CD16/CD32 (clone 93, eBioscience) for 10 min at 4°C. Then the cells were stained with the following antibodies,

used at concentrations recommended by the manufacturer: anti-CD4-FITC (clone RM4-4) and anti-CD8b.2-APC (clone 53-5.8) (Biolegend). BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) was used for flow cytometry acquisition and analyses were performed with the FlowJo® software (version 10.2, Ashland, OR).

Supplementary references

1. Heurtault B, Gentine P, Thomann J-S, Baehr C, Frisch B, Pons F. Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(2):276–285. doi:10.1007/s11095-008-9724-y
2. Roth A, Espuelas S, Thumann C, Frisch B, Schuber F. Synthesis of thiol-reactive lipopeptide adjuvants. Incorporation into liposomes and study of their mitogenic effect on mouse splenocytes. *Bioconjugate Chemistry*. 2004;15(3):541–553. doi:10.1021/bc034184t
3. Kakhi Z, Frisch B, Bourel-Bonnet L, Hemmerlé J, Pons F, Heurtault B. Airway administration of a highly versatile peptide-based liposomal construct for local and distant antitumoral vaccination. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;496(2):1047–1056. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.027

CHAPITRE 3

**Optimisation de la composition des
vaccins peptidiques à base de liposomes :
intérêt de l'association d'agonistes des
TLR et NLR**

L'**intelligence**, c'est la capacité de s'adapter au **changement**.

Stephen Hawking

A. Introduction

Bien que dans le domaine de la vaccination les travaux se soient concentrés pendant de nombreuses années sur la spécificité des vaccins et l'identification des TAA, il est maintenant évident que la sélection des adjuvants est une étape tout aussi importante dans l'élaboration d'un vaccin. En effet, les adjuvants influencent grandement le type et la puissance de la réponse immunitaire déclenchée et sont indispensables pour activer les DC et surmonter l'immunotolérance des tumeurs (Banday et al. 2015; Khong & Overwijk 2016a). Comme détaillé dans l'introduction, les agonistes des TLR et NLR font partie d'une nouvelle classe d'adjuvants et ont déjà montré des résultats très prometteurs en thérapie contre le cancer (Vacchelli et al. 2012b; Maisonneuve et al. 2014).

1. Agonistes des PRR et nanoparticules

Un des obstacles majeurs à l'utilisation d'agonistes des TLR solubles est leur forte toxicité systémique, en raison de leur diffusion dans d'autres tissus et le sang à partir du site d'administration. En effet, les premiers essais de thérapie avec des agonistes solubles ont induit des chocs cytokiniques et divers effets secondaires liés à l'inflammation induite par la circulation systémique de ces adjuvants (Engel et al. 2011). L'association d'agonistes des TLR à des nanoparticules a rapidement été évoquée comme étant la meilleure option pour diminuer la toxicité intrinsèque de certains agonistes et favoriser l'administration de molécules peu solubles (Storni et al. 2005).

Afin de mimer la stimulation de plusieurs PRR par un pathogène, il a été très récemment proposé d'utiliser des combinaisons d'agonistes pour induire une activation synergique des DC dans le cadre de la vaccination.

2. Association d'agonistes des TLR

Les TLR sont les premiers PRR à avoir été découverts ; ils forment une famille de récepteurs très bien caractérisés, capables de se lier à un grand nombre d'agonistes synthétiques (Bhardwaj et al. 2010). La combinaison d'agonistes de TLR a donc été une des premières stratégies envisagées, qui a déjà montré des résultats prometteurs dans des modèles précliniques (cf. ci-dessous).

2.1. Administration conjointe

Une équipe a récemment évalué des combinaisons de 2 ou 3 agonistes des TLR, conjugués séparément à des nanoparticules de PLGA puis administrés conjointement avec de l'ovalbumine comme antigène de référence (Madan-Lala et al. 2017). Ils ont montré que l'association d'agonistes du TLR4/TLR7 ou TLR4/TLR7/TLR8 favorisait la cross-présentation de peptides, et l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1.

Une autre équipe a également confirmé l'intérêt de la co-administration d'agonistes des TLR4 et TLR9, associés séparément à des nanoparticules de PLGA/PEI [poly (éthylène imine)] (Ebrahimian et al. 2017).

La co-administration d'agonistes ayant des solubilités différentes pose cependant soucis, à cause de leur cinétique de rétention et/ou de diffusion qui diffèrent. Ces différences affectent leur vitesse d'internalisation par les DC et de diffusion dans la lymphe, ayant pour conséquence qu'une même DC ne pourra percevoir le signal induit que par un seul des deux agonistes avant de migrer et de devenir mature. Il est donc préférable d'associer deux agonistes à une même nanoparticule afin de contrôler leur effet dépôt et s'assurer de leur délivrance simultanée à une DC.

2.2. Association à une même nanoparticule

Plusieurs équipes ont effectivement démontré l'effet synergique de l'association, au sein d'un même vecteur : des agonistes des TLR4 et TLR9 à des liposomes (Zhu et al. 2018), des TLR4 et TLR7 à des nanoparticules de PLGA (Kasturi et al. 2011) et des TLR3 et TLR9 encapsulés dans des liposomes (Bayyurt et al. 2017). Lors de ces trois études, des antigènes de mélanome (TRP2), de référence (OVA) ou viraux (HIV-1 p24) ont été administrés conjointement. Ces vaccins ont dans tous les cas permis une plus forte production de cytokines et d'anticorps de type Th1, accompagnée d'une réponse immunitaire durable et efficace.

2.3. Voies de signalisation des TLR

La synergie d'action de ces différents récepteurs peut s'expliquer par la stimulation de voies de signalisation complémentaires, menant à l'activation d'un plus grand nombre de facteurs de transcription et à l'amplification de la réponse immunitaire (Ouyang et al. 2007; Trinchieri & Sher 2007). Il a effectivement été montré que les TLR de surface (principalement le TLR4) agissaient en synergie avec les TLR endosomaux (TLR7, TLR8,

TLR9) (Napolitani et al. 2005). Leur activation conjointe permet une production 50 fois plus importante d'ARNm d'IL-12p35 et augmente de plus de 100 fois la production du ligand Delta-4 impliqué dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1. Cette équipe de recherche a également montré que la synergie était d'autant plus efficace lorsqu'il existe une « fenêtre temporelle » entre la liaison par deux agonistes. Ainsi, une nanoparticule contenant un agoniste du TLR4 va amorcer l'activation des DC en se liant à ce TLR de surface. La nanoparticule va ensuite être internalisée, et la liaison successive du second agoniste sur les TLR endosomaux va amplifier et maintenir la réponse immunitaire initiée précédemment.

Les différents TLR activent les protéines adaptatrices Myd88 (TLR2, TLR5, TLR7, TLR8, et TLR9), TRIF (TLR3) ou conjointement Myd88 et TRIF (TLR4) (**Figure 21**). Il a

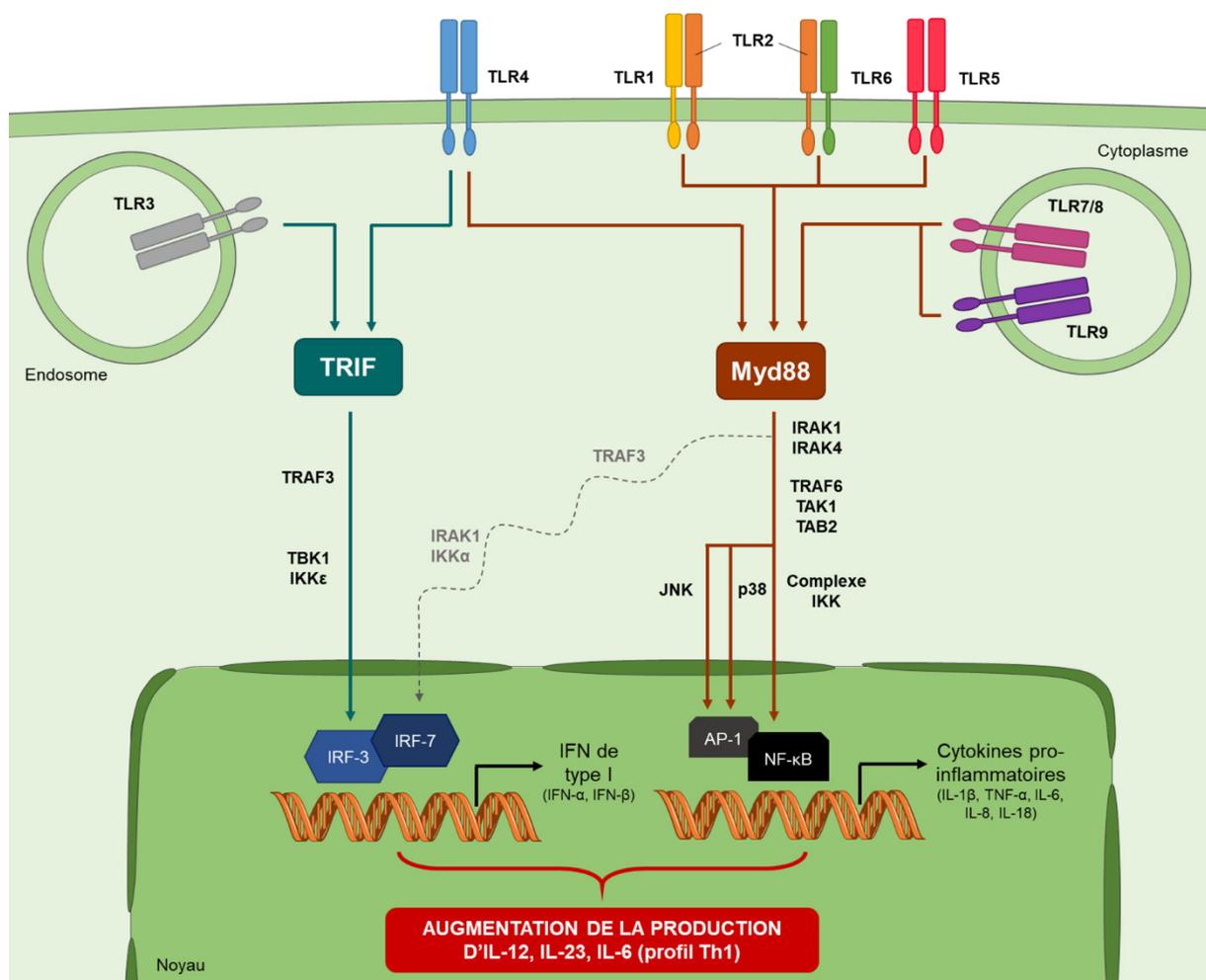


Figure 20. Résumé des voies de signalisation synergiques des TLR dans la cellule dendritique.

La voie de signalisation de TRIF est représentée en bleu, et celle de Myd88 en brun. Le TLR4 est capable d'activer les deux voies de signalisation. Une potentielle connexion entre ces voies est représentée en pointillé gris. Les deux voies de signalisation agissent en synergie pour la polarisation des DC vers un profil Th1 et l'augmentation de la production d'IL-12, IL-23, IL-6 et du ligand Delta-4.

été montré dans différentes études que l'action synergique des TLR était efficace principalement lorsque les voies de signalisation de Myd88 et de TRIF étaient engagées simultanément (Ouyang et al. 2007; Orr et al. 2014; Fischetti et al. 2017). Ces études démontrent clairement que l'utilisation d'un seul agoniste des TLR induit une activation suboptimale des DC, alors qu'une association de deux agonistes permettrait aux DC de développer pleinement leur capacité à induire une réponse immunitaire de type Th1.

3. Association d'agonistes des TLR-NLR

Suivant la théorie que les récepteurs synergiques doivent être présents dans des compartiments cellulaires distants et induire des voies de signalisation différentes, la potentielle interaction entre la famille des TLR et des NLR a également été évaluée (Strober et al. 2006). Il a été montré que l'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 agit en synergie avec la stimulation des TLR pour permettre un plus grand relargage de cytokines par les monocytes et DC *in vitro* (Tada et al. 2005; Fritz et al. 2007) ou pour améliorer l'activation des lymphocytes T CD8⁺ par l'intermédiaire de leurs TCR, en se liant directement à ces cellules (Mercier et al. 2012). Bien que les agonistes des récepteurs NOD induisent une réponse immunitaire de type Th2 lorsqu'ils sont administrés seuls, ils polarisent plutôt une réponse immunitaire de type Th1/Th17 lorsqu'ils sont associés à des agonistes des TLR (Fritz et al. 2007).

Pour expliquer ce changement de polarisation, plusieurs équipes ont étudié l'interaction des voies de signalisation des TLR et NLR. Contrairement à la synergie des récepteurs TLR, l'association TLR/NLR n'est pas dépendante de voies de signalisation complémentaires. Les agonistes des TLR et NLR semblent agir en synergie car ils amplifient l'expression des récepteurs de l'autre famille ou par l'intermédiaire d'interaction protéine-protéine à l'intérieur de leur voie de signalisation (**Figure 22**).

En effet, il a été montré qu'une stimulation par le TLR4 augmente l'expression de NOD1 et de NOD2. Inversement, une stimulation des récepteurs NOD augmente l'expression de la protéine Myd88 impliquée dans les voies de signalisation des TLR (Takada et al. 2002; Takahashi et al. 2006). Il semblerait que la protéine RIP2, qui est la protéine adaptatrice des récepteurs NOD, soit également activée par divers TLR (TLR2, TLR3, TLR4) même si la démonstration de cette activation croisée reste controversée (Strober et al. 2006). RIP2 interagit également avec plusieurs molécules des voies de

signalisation des TLR et augmente l'efficacité de ces molécules à activer le facteur de transcription NF- κ B.

Bien que la combinaison des TLR et NLR ait déjà donné des résultats prometteurs *in vitro*, cette association d'agonistes n'a pas encore été évalué *in vivo* dans des vaccins thérapeutiques contre le cancer. Au vu des arguments moléculaires en leur faveur, il serait intéressant de conjuguer des agonistes des TLR et NLR à une même nanoparticule pour évaluer l'efficacité thérapeutique antitumorale de leur association.

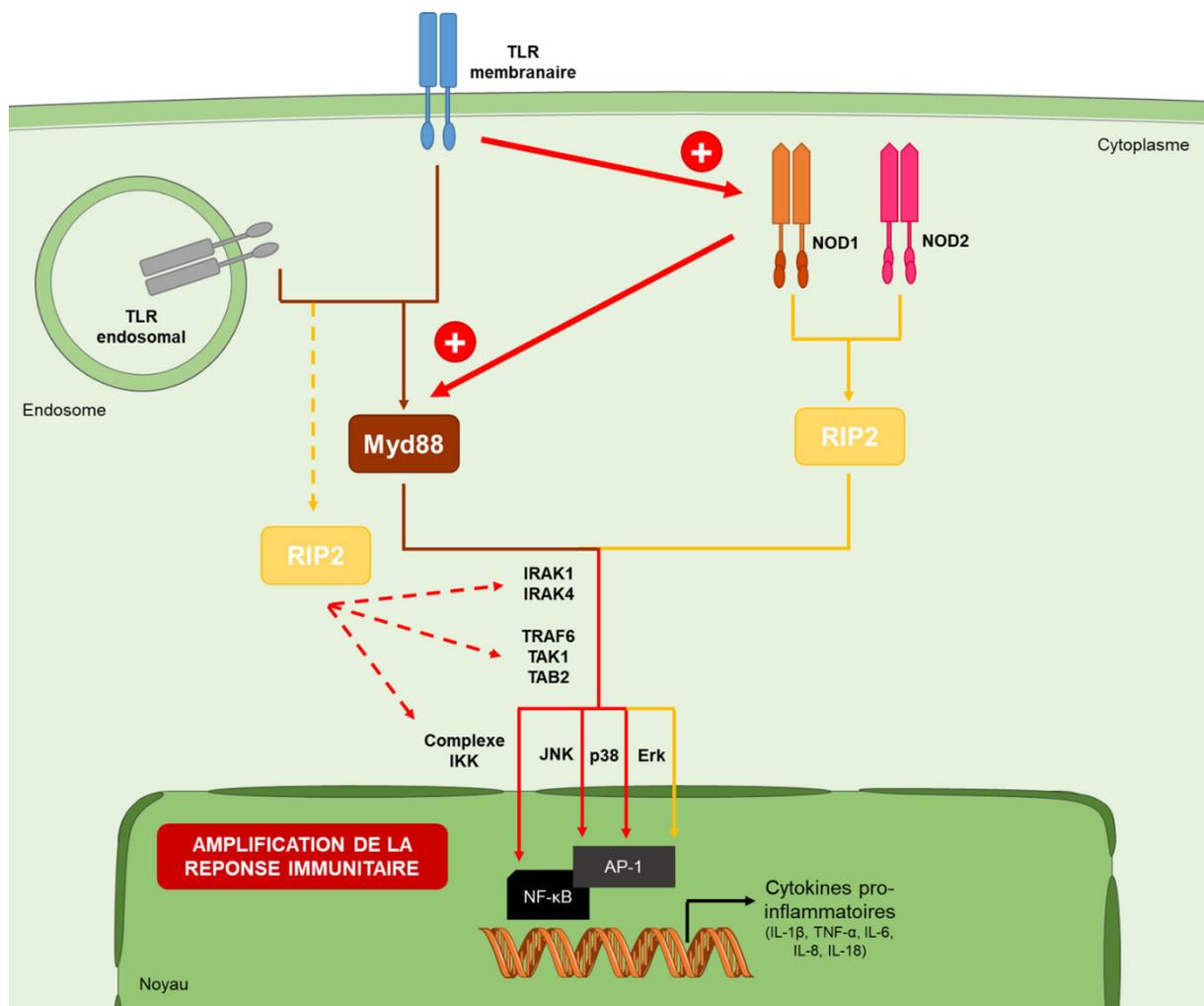


Figure 21. Résumé des voies de signalisation synergiques des TLR et NLR dans la cellule dendritique.

La voie de signalisation de Myd88 est représentée en brun, celle de RIP2 en jaune et les voies communes aux deux en rouge. Certains récepteurs induisent la surexpression d'autres protéines (schématisée par une flèche rouge et un signe « + »). La protéine RIP2 interagit positivement avec différents complexes de kinases impliqués dans l'activation de NF- κ B et AP-1 (flèche pointillée en rouge). Tous les événements en rouge participent à l'amplification de la réponse immunitaire induite par les récepteurs TLR et NLR.

4. Objectifs du chapitre

Dans la troisième partie de ce projet, nous avons donc souhaité améliorer davantage la capacité de nos vaccins antitumoraux à induire une forte réponse immunitaire de type Th1. Pour cela, nous avons évalué l'effet thérapeutique de différentes associations d'adjuvants parmi ceux évalués précédemment (**Figure 23**). Chaque formulation vaccinale contenait la même combinaison d'épitopes sélectionnée lors du **Chapitre 1** (peptide HA et E7) conjugués à la surface des liposomes grâce à une ancre amphiphile fonctionnalisée. Les liposomes comprenant une association de deux agonistes ont, à chaque fois, été comparés aux liposomes mono-adjuvantés respectifs. L'impact sur la progression tumorale et le profil immunitaire déclenché par les vaccins ont été évalués dans le modèle tumoral TC-1 utilisé dans les précédents chapitres.

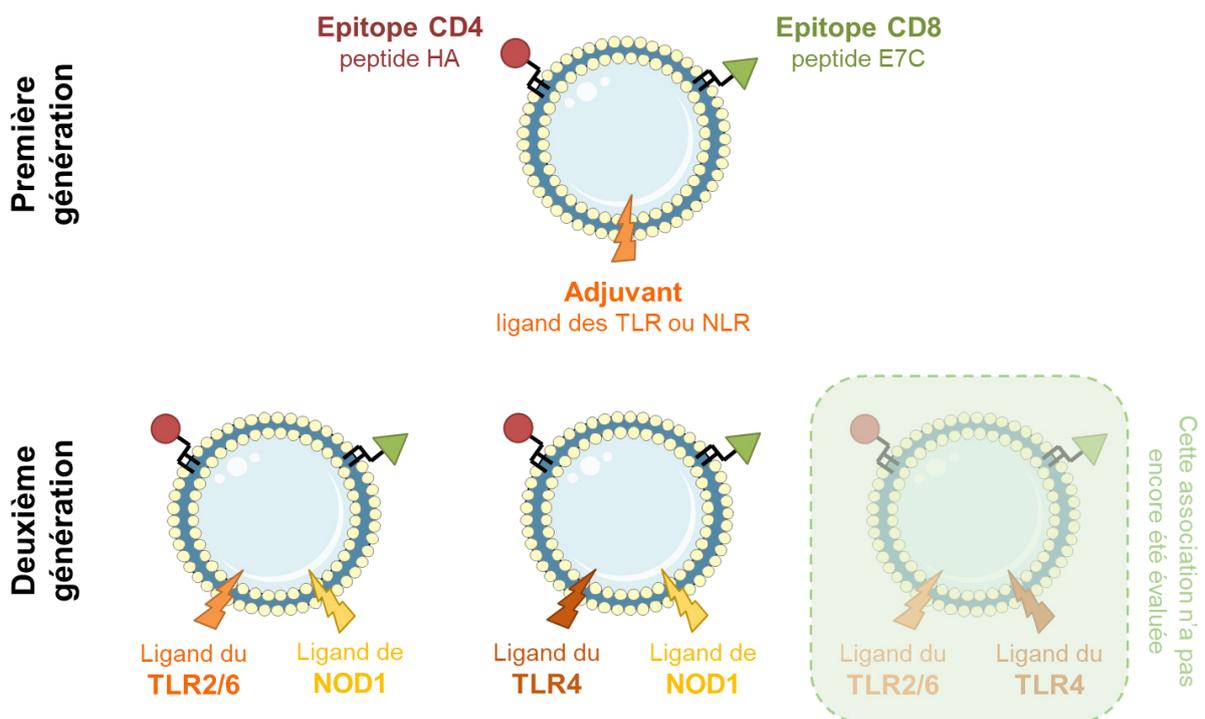


Figure 22. Formulations liposomiques développées dans le projet.

Lors du **Chapitre 1 et 2**, des liposomes de première génération contenant un seul type d'adjuvant ont été évalués et comparés. Dans le **Chapitre 3**, nous avons développé des liposomes de deuxième génération contenant deux types d'adjuvants intégrés à la même nanoparticule.

B. Matériels et méthodes

1. Formulation et caractérisation des formulations liposomiques

1.1. Lipides, adjuvants et peptides

Les fournisseurs des différents réactifs sont récapitulés dans le **Tableau 9** et la structure des éléments incorporés dans la membrane lipidique est présentée dans la **Figure 24**.

Tableau 9. Constituants des formulations liposomiques.

	Réactif	Détails	Fournisseur
Lipides	PC	L- α -phosphatidylcholine (jaune d'œuf)	Sigma-Aldrich
	PG	L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (jaune d'œuf)	Avanti Polar lipids
	Chol	Cholestérol	Sigma-Aldrich
	DPGMal	Dipalmitoylglycerol-maleimide	Synthétisé au laboratoire (Roth et al. 2004)
Adjuvants	Pam ₂ CAG	S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-(R)-cysteinyl-alanyl-glycine (agoniste du TLR2/6)	Synthétisé au laboratoire (Heurtault et al. 2009)
	MPLA	Monophosphoryl lipid A (agoniste du TLR4)	Invivogen
	C12iEDAP	Lauroyl- γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (agoniste de NOD1)	Invivogen
Peptides	HA 307-319	Séquence : PKYVKQNTLKLAT-C	Genosphere Biotechnologies
	E7 49-57	Séquence : RAHYNIVTF-C	Genosphere Biotechnologies
	MART 27-35	Peptide aspécifique contrôle (tests <i>in vitro</i>) Séquence : AAGIGILTV	Genosphere Biotechnologies

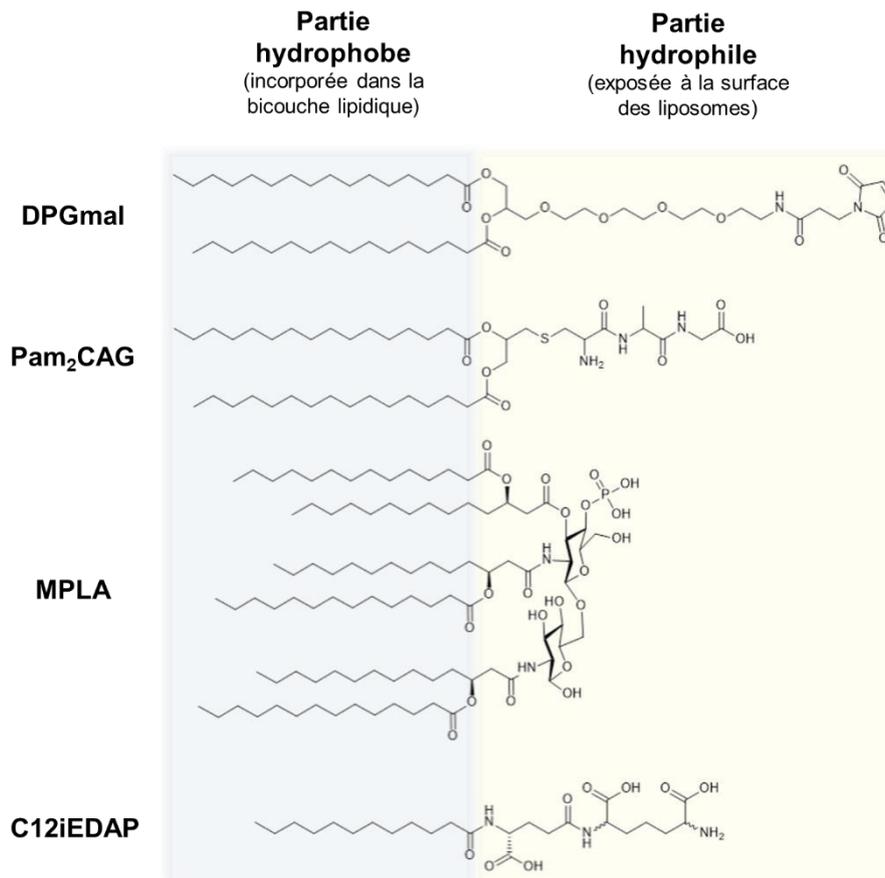


Figure 23. Adjuvants et ancre incorporés dans la membrane des SUV.

Ancre amphiphile fonctionnalisée. DPGMal : 19-(2,5-dioxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecane-1,2-diyl dipalmitate. Adjuvants. **Pam₂CAG** : 5-méthyl-4,7,15-trioxo-8-palmitamido-12-(palmitoyloxy)-14-oxa-10-thia-3,6diazatriacontan-1-oic acid. **MPLA** : 2-Deoxy-6-O-{2-deoxy-4-O-phosphono-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanamido]-3-O-[(R)-3-tetradecaoyloxytetradecanoyl]-b-D-glucopyranosyl}-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanamido]a/b-D-glucopyranose. **C12iEDAP** : 2-Amino-6-[(N-dodecanoyl-D-γ-glutamyl) amino]heptanedioic acid.

1.2. Formulation des SUV

Des liposomes unilamellaires (SUV) sont obtenus par la technique d'hydratation d'un film lipidique suivi d'une sonication utilisés lors des travaux précédents (**Figure 25**). Brièvement, différentes solutions de chloroforme/méthanol (9/1, v/v) contenant les lipides (PC, PG, Chol), l'ancre DPGmal et/ou les adjuvants sont mélangées puis la solution résultante est évaporée sous vide pendant 45 min dans un évaporateur rotatif. Les ratios molaires de chaque composant sont présentés dans le **Tableau 10** ; la dose de chaque adjuvant correspond à la quantité optimale sélectionnée lors du **Chapitre 1**. Le film lipidique obtenu est ensuite hydraté avec un tampon Hepes 10 mM 5% (p/v) sorbitol (pH 6,5) à une concentration finale de 15 mM de phospholipides, permettant la formation de

MLV. La suspension est ensuite soniquée (cycle de 1 s toutes les 3 s) sous argon pendant 1h à l'aide d'une sonde en titane Vibra Cell 75041 ultrasonicator (750 W, 20 kHz, 40% d'amplitude, 3 mm de diamètre, Fisher Bioblock Scientific, Waltham, MA). Cette étape permet la formation de SUV, d'une taille inférieure à 100 nm, contenant pour certaines formulations, une ancre DPGmal non couplée (liposomes préformés).

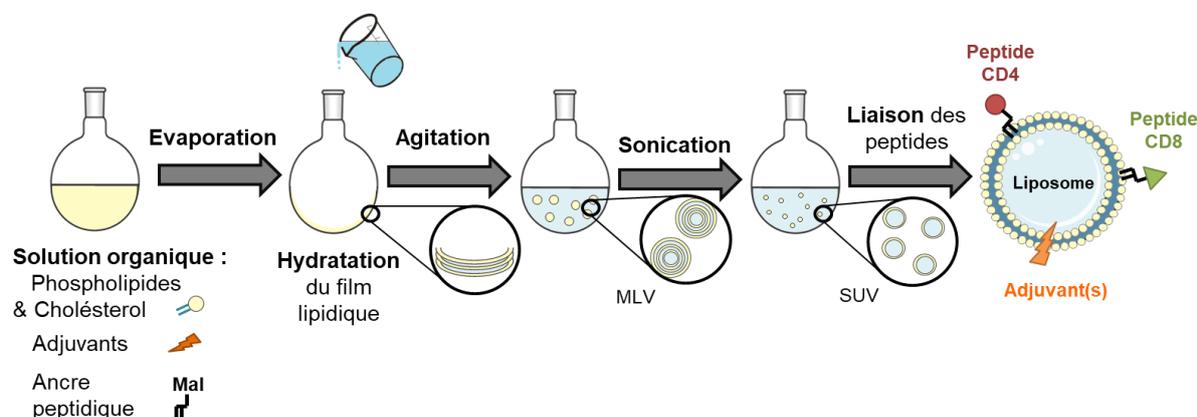


Figure 24. Méthode de formulation des liposomes SUV.

Cette méthode de formulation classiquement utilisée au laboratoire permet la formation de liposomes composés d'une seule bicouche lipidique, contenant des adjuvants lipophiles incorporés dans la membrane plasmique et des peptides conjugués à la surface des liposomes sur des ancres fonctionnalisées amphiphiles.

Tableau 10. Composition molaire des SUV.

Construction liposomique	Bicouche lipidique		Peptides	
	Composition	Ratio molaire	Compo- sition	Ratio molaire
Lp. Blc	PC/PG/Chol	54/13/33	-	-
Lp. TLR2/6	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG	50,9/13/33/3/0,1	HA/E7	0,75/0,75
Lp. TLR4	PC/PG/Chol/DPGmal/MPLA	51/13/33/3/0,007		
Lp. NOD1	PC/PG/Chol/DPGmal/C12iEDAP	50,67/13/33/3/0,3		
Lp. TLR2/6- NOD1	PC/PG/Chol/DPGmal/Pam ₂ CAG/ C12iEDAP	50,67/12/33/3/0,1/ 0,23		
Lp. TLR4- NOD1	PC/PG/Chol/DPGmal/MPLA/ C12iEDAP	50,77/13/33/3/0,007/ 0,23		

Lp. : liposome, PC : phosphatidylcholine, PG : phosphatidylglycérol, Chol : cholestérol, DPGmal: dipalmitoyl glycérol-maléimide, Pam₂CAG : dipalmitoyl-cysteine-alanyl-glycine, MPLA : monophosphoryl lipid-A, C12iEDAP : dérivé acylé du γ -D-Glu-mDAP.

1.3. Conjugaison des peptides à la surface des liposomes

Les peptides HA et E7 (**Tableau 1**) ont été dissous dans de l'eau milliQ puis traités avec 0,7 M éq. de tris(2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride (Sigma-Aldrich) pendant 15 min sans argon, afin d'éliminer les éventuels ponts disulfures inter-peptides. Des quantités équimolaires de peptides sont ensuite couplés aux liposomes préformés (0,75 éq. molaire de chaque peptide), grâce à la réaction de Michael qui se déroule pendant 4h à TA sous argon. Une fois le couplage terminé, un excès de β -mercaptoéthanol est ajouté pendant 30 min aux liposomes, afin de réduire les fonctions maléimides de l'ancre qui n'auraient pas réagi avec les peptides. Pour finir, la solution est dialysée (Spectra/Por, 12–14 kDa, Spectrum laboratories) pendant 36h à 4°C, dans du tampon (Hepes 10 mM sorbitol 5% pH 7,4) afin d'éliminer les molécules libres non associées avec les liposomes. Finalement, 4% de glucose (p/v) est ajouté en tant que cryoprotecteur, et les formulations sont congelées très rapidement dans de l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C jusqu'à leur injection.

1.4. Caractérisation des formulations liposomiques

1.4.1. *Diamètre*

Le diamètre moyen des liposomes est déterminé par diffusion dynamique de la lumière en utilisant le Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments, Orsay, France) avec les paramètres suivants : viscosité: 1,014 cP; indice de réfraction: 1,34; angle de diffusion: 90°; température: 25 °C. Les SUV ont été dilués au 100^e dans du tampon, chaque formulation a fait l'objet d'une mesure en triplicat. La taille des nanoparticules est exprimée en intensité. Les échantillons sont considérés comme monodisperses si l'indice de polydispersité (PDI) est inférieur à 0,3.

1.4.2. *Potentiel zêta*

La potentiel zêta (reflet de la charge de surface) des liposomes est déterminé dans les mêmes conditions que la taille, avec le Zetasizer Nano-ZS. Le potentiel zêta est calculé d'après la mobilité électrophorétique de l'échantillon, basé sur l'approximation de Smoluchowski.

1.5. Dosage de la phosphatidylcholine

La quantité de PC dans les liposomes a été dosée en utilisant un kit commercial (LabAssay™ Phospholipid kit, Wako, Richmond, VA). Brièvement, 1 à 2 μL de SUV sont incubés avec 200 μL de tampon enzymatique pendant 10 min à 37°C, en triplicat dans une plaque 96 puits. Le tampon contient de la phospholipase C qui induit la libération de la choline. Celle-ci est ensuite oxydée par la choline oxydase, ce qui entraîne la production de peroxyde d'hydrogène, utilisé par la peroxydase pour produire un colorant bleu quantifiable par mesure d'absorbance à $\lambda = 595 \text{ nm}$. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles obtenues avec une gamme étalon de choline purifiée afin de déterminer la concentration en PC des échantillons. Ce dosage enzymatique de la PC permet de déduire la concentration relative des autres composants de la membrane des liposomes (lipides, adjuvants, ancre).

1.6. Dosage des peptides

La quantification des peptides couplés à la surface de chaque liposome a été réalisée en utilisant la fluorescamine (4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dione, Sigma-Aldrich) qui réagit avec les amines primaires pour former un produit fluorescent. Brièvement, les acides aminés sont libérés par hydrolyse acide des liposomes couplés, en présence d'HCl 12N, à 110°C pendant 12h. Après neutralisation avec de la soude 6N, 20 μL de la solution hydrolysée est ajoutée à 250 μL d'une solution de fluorescamine dans du dioxane (300 mg/L) et 750 μL de tampon borate (50 mM, pH 9). La fluorescence est mesurée extemporanément ($\lambda_{\text{excitation}} = 400 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{émission}} = 480 \text{ nm}$) et comparée à une gamme étalon contenant un mélange physique de peptides et de liposomes. Le taux de couplage a été calculé d'après la quantité de fonction maléimide présente à la surface des SUV.

2. Evaluation *in vivo* des constructions liposomiques

2.1. Souris

Les souris mâles C57BL/6J, âgées de 6-8 semaines, proviennent de chez Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Les expériences *in vivo* ont été réalisées dans le respect de la directive européenne CEE directive 2010/63/EU du 22 septembre 2010, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et dans le respect du

décret français n° 2013–118 du 1^{er} février 2013 et suivant l'approbation du CREMEAS (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg), numéro d'autorisation : APAFiS #10825- 2017073117337272.

2.2. Lignée cellulaire tumorale

Tous les réactifs utilisés pour la culture cellulaire ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les cellules TC-1, exprimant la protéine E7 de l'HPV16, ont été obtenues d'ATCC® (CRL-2785™). Cette lignée cellulaire a été dérivée de cellules épithéliales pulmonaires de souris C57BL/6J, immortalisées par transduction du rétrovirus LXS16E6E7 et transformées par le plasmide pVEJB portant le gène c-HA-ras. Les cellules TC-1 ont été cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de FCS, 100U/mL pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, et ont été incubées à 37°C, 5% de CO₂ et 80% d'humidité.

2.3. Calendrier d'injection

Les souris ont reçu 1x10⁵ cellules TC-1 (dans 100 µL de sérum physiologique) par voie i.v. au niveau de leur veine caudale. Dans chaque expérience, deux administrations s.c. de vaccins ont été injectées au niveau du flanc droit des souris, à deux jours d'intervalle. Les traitements liposomiques contenaient 15 µg de peptide E7 dans 100 µL de tampon HEPES/sorbitol ou une quantité équivalente de lipides (~1mg) pour le groupe contrôle traité avec des liposomes blancs (ne contenant ni peptide ni adjuvant). L'intervalle entre l'injection des cellules tumorales et la première administration de vaccin varie et est spécifié dans la légende des figures.

Les souris ont été euthanasiées 28 jours après l'injection des tumeurs. Les poumons des souris ont été récoltés pour évaluer la progression tumorale et contrastés par injection intratrachéale de 15% d'encre de chine, suivie par une décoloration et fixation dans un tampon de Fekete (10 mL acide acétique, 80 mL formaldéhyde 40%, 580 mL éthanol 100% et 200 mL eau). Pour chaque souris, le nombre de nodules tumoraux, qui apparaissent blancs par rapport à la surface noire des poumons, a été compté grâce à une lampe-loupe.

A 28 jours, la rate et les ganglions lymphatiques drainants la zone d'injection (axillaire et inguinale) ont également été récupérés afin d'analyser la réponse immunitaire antitumorale induite par les vaccins. Les organes provenant du même groupe de

traitement ont été regroupés, dissociés et filtrés sur un tamis cellulaire de 70µm (BD Falcon™). Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées à 200g pendant 5 min, et le culot de cellules ganglionnaires a été re-suspendu dans du RPMI 2% SNS (sérum normal de souris) (Dominique Dutscher). Pour lyser les globules rouges, les splénocytes ont été re-suspendus dans un tampon ACK, à TA pendant 30 s. La suspension cellulaire a ensuite été diluée dans du RPMI, centrifugée puis re-suspendue dans du RPMI 2% SNS. Les cellules ont été comptées puis diluées pour leur utilisation dans d'autres protocoles (voir ci-dessous).

2.4. Analyse de la réponse immunitaire

2.4.1. *ELISpot (IFN-γ)*

Des plaques 96 puits contenant une membrane de PVDF (Multiscreen® HTS filter plates, Merck Millipore) ont été activées par de l'éthanol 35% pendant 1 min et incubées avec un anticorps purifié anti-IFN-γ de souris (clone AN-18, eBioscience) dans du PBS, toute la nuit à 4°C. Après trois lavages avec du PBS, les membranes ont été saturées avec du RPMI 10% FCS pendant 2h à 37°C, puis lavées avec du RPMI. Les cellules de la rate ou des ganglions ont ensuite été cultivées dans les puits en triplicat (4×10^6 cellules/mL) en présence d'IL-2 humaine (30 UI/mL), et incubées avec le peptide HA ou E7 (10 µg/mL), un peptide aspécifique contrôle (10 µg/mL) ou les cellules TC-1 (125×10^3 cellules/mL). Les cellules cultivées dans du milieu seul ou avec 1,25 µg/mL de concanavalin-A (Sigma-Aldrich) ont servi de contrôle négatif et positif respectivement. Après 20-24h d'incubation à 37°C, les plaques ont été lavées avec du PBS 0,01% Tween 20 et les spots ont été révélés suite à des incubations successives en présence d'anti-IFN-γ biotinylé (clone R4-6A2, eBioscience), de phosphatase alcaline conjuguée à de l'extravidine et d'un substrat chromogène, le BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). Les spots correspondant au nombre de cellules ayant produit de l'IFN-γ ont été comptés en utilisant un lecteur de plaques Bioreader 4000 PRO-S (Biosys, Karben, Germany). Le nombre de spots obtenu avec le contrôle négatif (milieu seul) a été soustrait aux autres conditions, puis normalisé par millions de cellules.

2.4.2. *ELISA (IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-13, IL-6, IL-17)*

Une partie des cellules de rate et de ganglions a également été mise en culture dans une plaque 96 puits à fond rond et a été incubée dans les mêmes conditions que pour

l'ELISpot. Les cytokines produites par ces cellules ont été mesurées par ELISA après 72h d'incubation. Les paires d'anticorps et les standards d'IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-13, IL-6 et IL-17 ont été utilisés aux concentrations recommandées par les fournisseurs (**Tableau 11**). Brièvement, les anticorps purifiés dans un tampon de coating (carbonate/bicarbonate 0,05 M, pH 9,6) ont été incubés sur la nuit à 4°C dans une plaque ELISA (Microlon™, Greiner Bio-One). La plaque a ensuite été lavée puis saturée avec du PBS 0,05% Tween 20 contenant 1% de BSA et incubées successivement avec les anticorps biotinylé, l'avidine couplée à une peroxidase, et le substrat chromogène (1,25 mM tetramethylbenzidine, 13,05 mM H₂O₂ dans un tampon citrate 0,1 M pH 5). La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'HCl 1N et l'absorbance à 450 nm est lue avec un spectrophotomètre (Safas SP2000, Xenius 5801, Monaco).

Tableau 11. Références des anticorps utilisés lors de l'ELISpot et de l'ELISA.

Anticorps purifié	Anti IFN- γ purifié	Anti TNF- α purifié	Anti IL-5 purifié	Anti IL-13 purifié	Anti IL-6 purifié	Anti IL-17 purifié
Clone	AN-18	1F3F3D4	TRFK5	eBio13A	MP5-20F3	Non spécifié
Anticorps biotinylé	Anti IFN- γ biotinylé	Anti TNF- α biotinylé	Anti IL-5 biotinylé	Anti IL-13 biotinylé	Anti IL-6 biotinylé	Anti IL-17 biotinylé
Clone	R4-6A2	XT22/XT3	TRFK4	eBio1316H	MP5-32C11	Non spécifié
Fournisseur	eBioscience (Waltham, MA)				Biolegend (San Diego, CA)	R&D systems (Minneapolis, MN)

3. Analyses statistiques

Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et les différences statistiques ont été calculées grâce au logiciel GraphPad Prism 7.0 software. Pour l'analyse de la progression tumorale, un test d'analyse de la variance à un facteur non paramétrique a été utilisé (ANOVA, Kruskal-Wallis avec correction de Dunn). Pour l'analyse de la réponse immunitaire (ELISpot et ELISA), un test d'analyse de la variance à deux facteurs a été utilisée (ANOVA avec correction de Dunnett). Les différences entre les groupes sont considérées comme significatives si * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

C. Résultats

1. Formulation et caractérisation des vaccins liposomiques

Le but de cette étude était de concevoir des vaccins thérapeutiques contre le cancer contenant deux types d'agonistes des PRR et de comparer leur efficacité thérapeutique par rapport aux formulations mono-adjuvantées. Parmi les trois associations que nous souhaitons évaluer, deux combinaisons ont déjà été formulées contenant un agoniste des TLR et un agoniste des NLR : « Liposomes TLR2/6-NOD1 » et « Liposomes TLR4-NOD1 ».

Les liposomes contenant deux agonistes et leurs équivalents mono-adjuvantés ont été conçus par une méthode classique d'hydratation d'un film lipidique suivie d'une sonication (**Figure 25**). Les nanoparticules étaient composées de PC, PG, Chol et d'une ancre fonctionnalisée DPGmal, leurs ratios sont détaillés dans le **Tableau 10**

Tableau 10. Les peptides HA et E7C (épitopes CD4 et CD8 respectivement) ont été conjugués aux liposomes par l'intermédiaire d'une liaison covalente entre un groupement thiol porté par leur cystéine et la fonction maléimide de l'ancre DPGmal. Chaque formulation, exceptés les liposomes contrôles (Lp. Blc), contenait un ou plusieurs types d'agonistes amphiphiles intégrés à leur membrane lipidique : un agoniste du TLR2/6 (Pam₂CAG), du TLR4 (MPLA) et/ou de NOD1 (C12iEDAP). Le ratio molaire de chaque agoniste et la quantité d'adjuvant injectée aux souris ont été choisis suivant la dose optimale déterminée lors du **Chapitre 1**.

Les suspensions liposomiques obtenues avaient une taille d'environ 65 nm pour les liposomes blancs ou comprise entre 81 et 97 nm pour les formulations plus complexes (**Tableau 12**). Indépendamment de leur composition, toutes les formulations présentaient un indice de polydispersité (PDI) inférieur à 0,3, attestant de la monodispersité de la suspension. Le potentiel zêta, qui est le reflet de la charge de surface des nanoparticules, était uniformément négatif, avec une très faible variabilité entre les échantillons (-50 à -63 mV). Le taux de couplage des peptides dépassait toujours 80% de liaison par rapport à l'ancre maléimide disponible à la surface des liposomes.

D'après ces résultats préliminaires, la combinaison de deux agonistes au sein d'un même liposome ne semble pas modifier les caractéristiques physicochimiques ou le taux de couplage peptidique, lorsqu'on les compare aux formulations mono-adjuvantées. La

technique de formulation des liposomes que nous employons est donc reproductible et permet d'obtenir des nanoparticules d'une taille inférieure ou égale à 100 nm ayant un potentiel zêta négatif et portant 3 à 4 éléments vaccinaux.

Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques des vaccins liposomiques.

Les résultats présentés ci-dessous sont la moyenne d'une à trois formulations indépendantes (avec 3 mesures en triplicat pour chaque échantillon). Les mesures ont été réalisées après décongélation, avant l'injection des vaccins.

Construction liposomique	Taille		Potentiel zêta (mV)	Taux de couplage peptidique (%)	Quantité d'adjuvants (µg/dose)
	Diamètre moyen (nm)	PDI			
Lp. B1c	65 ± 14	0,196	-60 ± 8	-	-
Lp. TLR2/6	81 ± 10	0,180	-51 ± 6	92	2
Lp. TLR4	97 ± 11	0,202	-63 ± 6	100	0,2
Lp. NOD1	92 ± 18	0,257	-61 ± 6	99	2
Lp. TLR2/6-NOD1	86 ± 16	0,215	-50 ± 7	80	TLR2/6 : 2 NOD1 : 2
Lp. TLR4-NOD1	93 ± 17	0,213	-60 ± 8	100	TLR4 : 0,2 NOD1 : 2

Lp. : liposome, PDI : *polydispersity index*

2. Evaluation de l'association des agonistes TLR2/6 - NOD1 au sein des liposomes

Des études *in vitro* ont montré que les récepteurs NOD1 et TLR2 agissent en synergie pour induire une plus forte production de cytokines par les DC et polarisent une réponse immunitaire de type Th1 (Fritz et al. 2007). Cette association n'a cependant pas encore été exploitée pour le développement de vaccins antitumoraux. Nous avons donc évalué l'efficacité de vaccins contenant les agonistes du TLR2/6 (Pam₂CAG) et/ou de NOD1 (C12iEDAP) dans le modèle tumoral TC-1 précédemment utilisé. Les souris ont reçu 1x10⁵ cellules TC-1 par voie i.v., puis ont été vaccinées par voie s.c. avec les formulations liposomiques aux jours 8 et 10. Ce calendrier d'injection correspond à la date d'apparition

des nodules pulmonaires ainsi qu'à la limite d'efficacité du traitement liposomes TLR2/6, qui perd son effet antitumoral lorsqu'il est injecté plus de 6 jours après l'injection des cellules TC-1 (**Chapitre 2**)

Comme attendu, le traitement liposomes TLR2/6 seul n'a pas permis de diminuer de façon significative la croissance tumorale contrairement au traitement liposomes NOD1 qui a induit une diminution du nombre de nodules tumoraux sur les poumons (**Figure 26A**). Étonnamment, nous avons observé que le groupe liposomes TLR2/6-NOD1 présentait le même nombre de nodules pulmonaires que celui traité avec l'agoniste du TLR2/6 seul. D'après ces résultats, il semblerait donc que l'association des deux agonistes masque l'activité adjuvante de l'agoniste de NOD1. Afin de confirmer ce résultat, nous avons injecté les mêmes formulations deux jours plus tôt lorsque les liposomes TLR2/6 sont toujours efficaces (**Figure 26B**). A ce calendrier d'injection, nous avons cependant observé que les liposomes TLR2/6-NOD1 avaient en réalité une efficacité thérapeutique plus faible que les liposomes mono-adjuvantés. Pour tenter d'améliorer la réponse immunitaire induite par nos vaccins, nous avons essayé d'augmenter la quantité

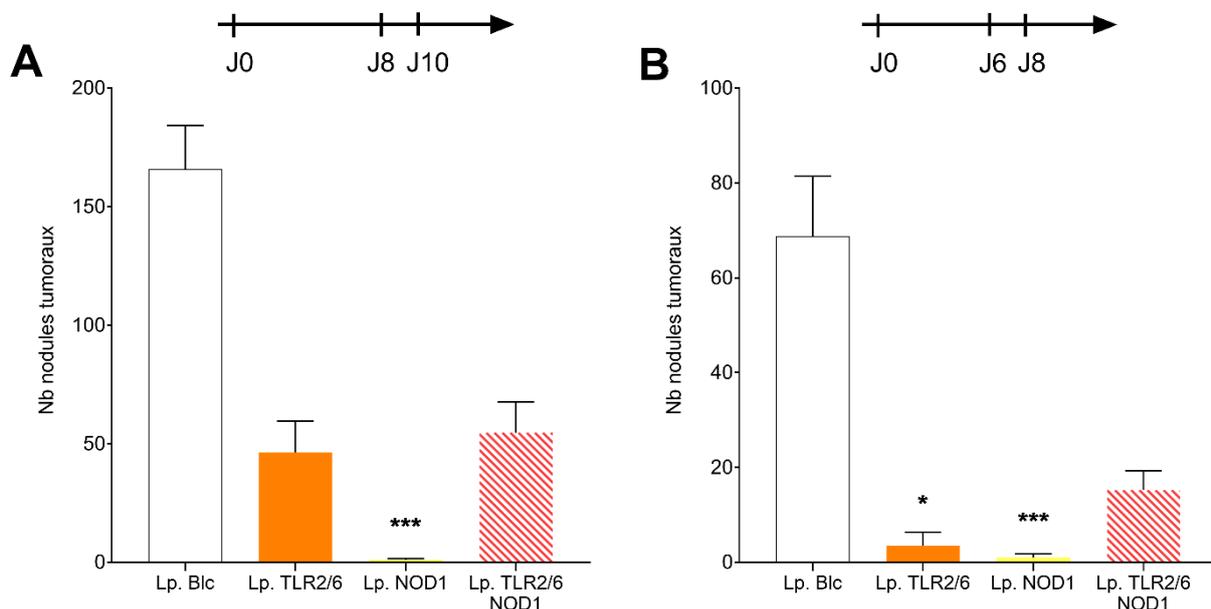


Figure 25. Efficacité antitumorale de l'association d'agonistes du TLR2/6 et/ou de NOD1.

Suite à une injection i.v. de 1×10^5 cellules TC-1, les souris ont reçu deux administrations s.c. à deux jours d'intervalle, de liposomes blancs ou de vaccins peptidiques contenant un agoniste du TLR2/6, un agoniste de NOD1 ou les deux agonistes. 5 souris par groupe ont été vaccinées aux jours 8 et 10 (**A**) ou aux jours 6 et 8 (**B**). 28 jours plus tard, les poumons ont été collectés et contrastés pour permettre la numération des nodules tumoraux. La moyenne \pm SEM du nombre de nodules par poumons est représentée. Les différences statistiques ont été calculées suivant un test d'analyse de la variance à un facteur (ANOVA), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

d'agoniste de NOD1 (l'adjuvant le plus efficace) en formulant des liposomes contenant la même quantité de Pam₂CAG (ligand du TLR2/6) avec dix fois plus de C12iEDAP (ligand de NOD1). Suite à l'injection en sous-cutanée de ces formulations dans des souris portant des tumeurs, une très forte réponse inflammatoire a été observée autour de la zone d'injection, résultant en une nécrose des tissus. Nous avons donc arrêté l'expérience pour le bien-être des souris.

Suite à l'échec de cette association, qui vient contredire les résultats observés par Fritz *et.al.*, nous avons donc postulé que l'association de ces deux agonistes inhibait l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale. et donc supprimait l'efficacité antitumorale de nos vaccins. Pour vérifier cette hypothèse, la rate et les ganglions lymphatiques des souris vaccinées aux jours 6 et 8 ont été collectés pour analyser l'influence des différents traitements sur la réponse immunitaire adaptative. Nous avons observé que les liposomes mono-adjuvantés provoquaient la différenciation d'un nombre significatif de cellules productrices d'IFN- γ en réponse au peptide E7C, au niveau de la rate et des ganglions (**Figure 27A, B**). Au contraire, les souris traitées avec les deux agonistes présentaient un plus faible nombre de lymphocytes T spécifiques contre le peptide E7C et les cellules TC-1, qui n'était pas significativement différent comparé au

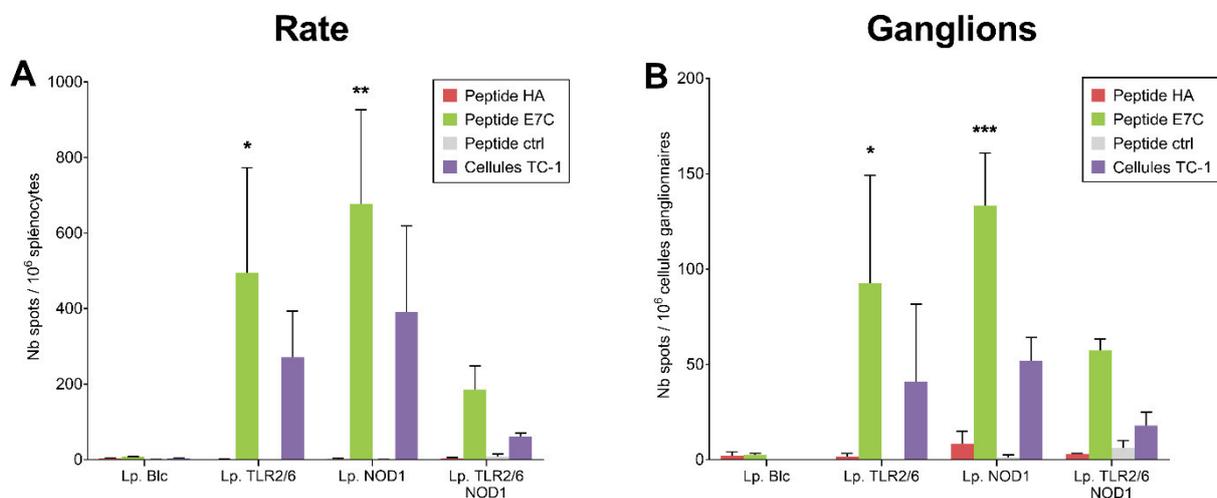


Figure 26. Réponse immunitaire induite par l'association d'agonistes du TLR2/6 et/ou de NOD1.

Au jour 28, la rate (**A**) et les ganglions lymphatiques axiaux et inguinaux drainants la zone d'injection (**B**) ont été récupérés chez les souris portant des tumeurs et vaccinées aux jours 6 et 8. Le nombre de cellules produisant de l'IFN- γ a été mesuré par ELISpot après 24h d'incubation en présence des peptides HA, E7C et contrôle (10 μ g/mL) ou des cellules TC-1 (125x10³ cellules/mL). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM du nombre de spots/10⁶ cellules immunitaires (n=2). Les différences statistiques ont été calculées suivant un test d'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

traitement contrôle (Lp. Blc). La faible efficacité thérapeutique du traitement liposomes TLR2/6-NOD1 est donc liée à une inhibition de la réponse immunitaire induite par ce vaccin.

Ces résultats laissent supposer que les souris vaccinées avec les deux agonistes du TLR2/6 et de NOD1 présentent un déficit dans la production d'IFN- γ , qui peut être lié à l'induction d'une plus faible réponse immunitaire de type Th1 ou à la polarisation d'une réponse de type Th2. Nous avons donc souhaité étudier le profil cytokinique présent dans les souris vaccinées pour mettre en évidence le type de réponse immunitaire déclenchée par cette association d'adjuvants. Nous avons observé que les liposomes mono-adjuvantés activaient principalement des cellules immunitaires capables de produire de l'IFN- γ en réponse au peptide E7C et aux cellules tumorales, ou de l'IL-6 en présence des

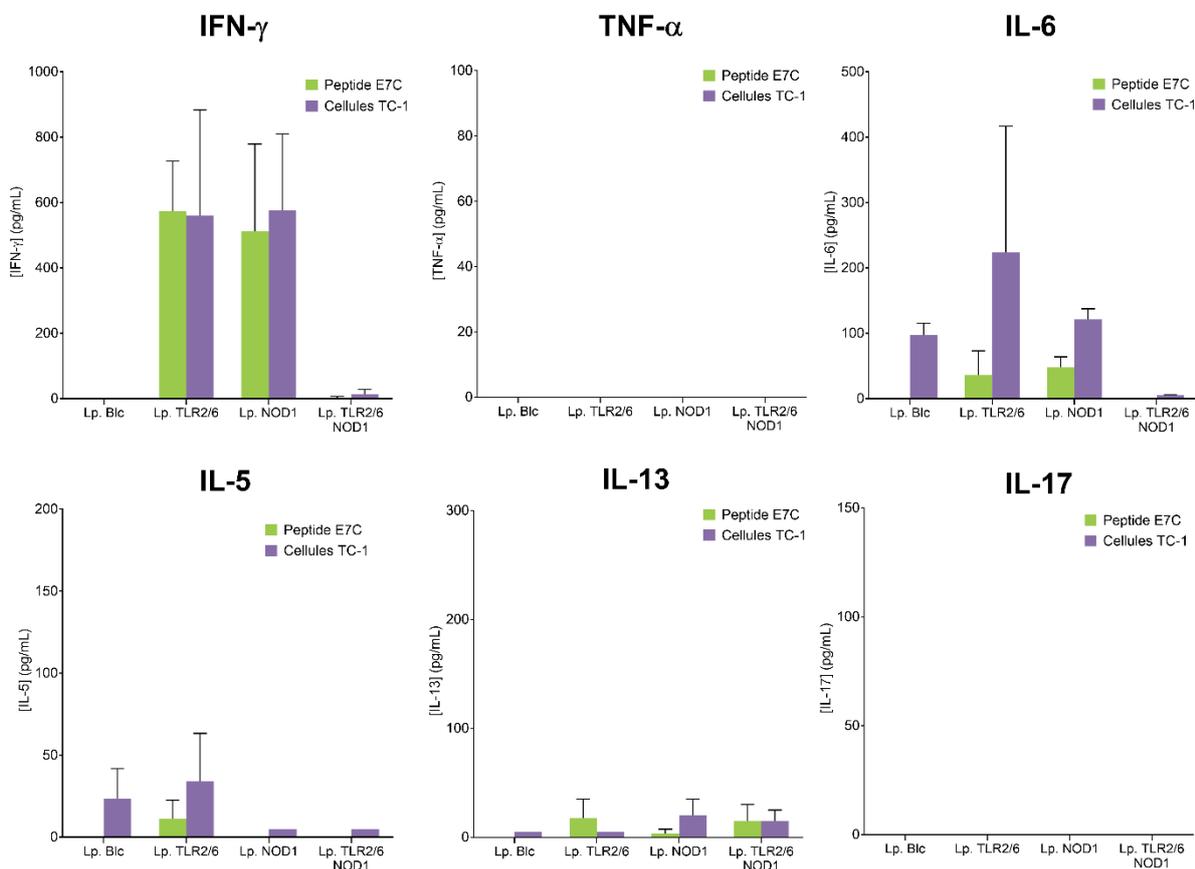


Figure 27. Production de cytokines par les splénocytes de souris vaccinées avec des liposomes contenant un agoniste du TLR2/6 et/ou NOD1.

Les suspensions de splénocytes préparées à partir des rate de souris vaccinées aux jours 8 et 10 ont également été analysées dans des tests ELISA. Les splénocytes ont été mis en culture pendant 72h en présence du peptide E7C (10 $\mu\text{g/mL}$) ou des cellules TC-1 (125x10³ cellules/mL). Le milieu de culture a ensuite été analysé par ELISA afin de mesurer la production d'IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-5, IL-13 et IL-17 par les splénocytes (n=2).

cellules TC-1 (**Figure 28**). Ces résultats ne sont pas étonnants, car nous avons déjà montré dans le **Chapitre 2** que ces deux agonistes déclenchaient principalement une réponse de type Th1. En revanche, aucune production de cytokines n'a pu être détectée chez les souris traitées avec les liposomes TLR2/6-NOD1. Il semblerait donc que l'association des deux agonistes inhibent l'induction d'une réponse immunitaire, sans pour autant déclencher de réponse immunitaire de type Th2 (production d'IL-5 ou d'IL-13).

3. Evaluation de l'association des agonistes de TLR4 - NOD1 au sein des liposomes

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer l'association d'un agoniste du TLR4 (MPLA) et de NOD1 (C12iEDAP) dans un même vaccin liposomique. La double stimulation de ces récepteurs par d'autres agonistes a déjà montré des effets synergiques *in vitro* sur les DC humaines (Tada et al. 2005) ou *in vivo* dans des souris saines immunisées (Chamaillard et al. 2003), mais cette association n'a jamais été évaluée dans un contexte de vaccination thérapeutique contre le cancer.

Suivant le même protocole que précédemment, les souris ont été injectées avec les cellules TC-1 par voie i.v. avant de recevoir deux administrations vaccinales à deux jours d'intervalle. Les expériences précédentes avaient montré que les liposomes mono-adjuvantés perdaient leur efficacité antitumorale lorsqu'elles étaient injectées après 12 jours (**Chapitre 2**). Pour observer une potentielle synergie d'action des agonistes, les vaccins ont donc été injectés aux jours 14 et 16 après l'implantation des tumeurs, lorsque les traitements mono-adjuvantés n'étaient plus efficaces.

Comme observé précédemment, les constructions vaccinales contenant un seul adjuvant, que ce soit l'agoniste de NOD1 ou l'agoniste de TLR4, présentaient une très faible efficacité à ce stade de développement tumoral (**Figure 29A**). Au contraire, le traitement liposomes TLR4-NOD1 a induit une diminution de plus de 50% du nombre de nodules tumoraux présents dans les poumons. La construction vaccinale contenant les deux adjuvants semble donc présenter une efficacité antitumorale plus importante que les vaccins ne contenant qu'un seul adjuvant, lorsqu'elle a été administrée 2 semaines après l'injection des cellules TC-1.

Cette efficacité thérapeutique est en corrélation avec la réponse immunitaire observée au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques des souris (**Figure 29B, C**). En effet,

le traitement liposomes TLR4-NOD1 a induit la différenciation d'un très grand nombre de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ en réponse au peptide E7C et aux cellules TC-1, comparé aux liposomes mono-adjuvantés ou liposomes blancs. Une forte réponse contre le peptide HA a également été observée dans cette expérience, alors que celle-ci n'était pas visible lors des précédentes expériences présentées dans ce manuscrit. Cette

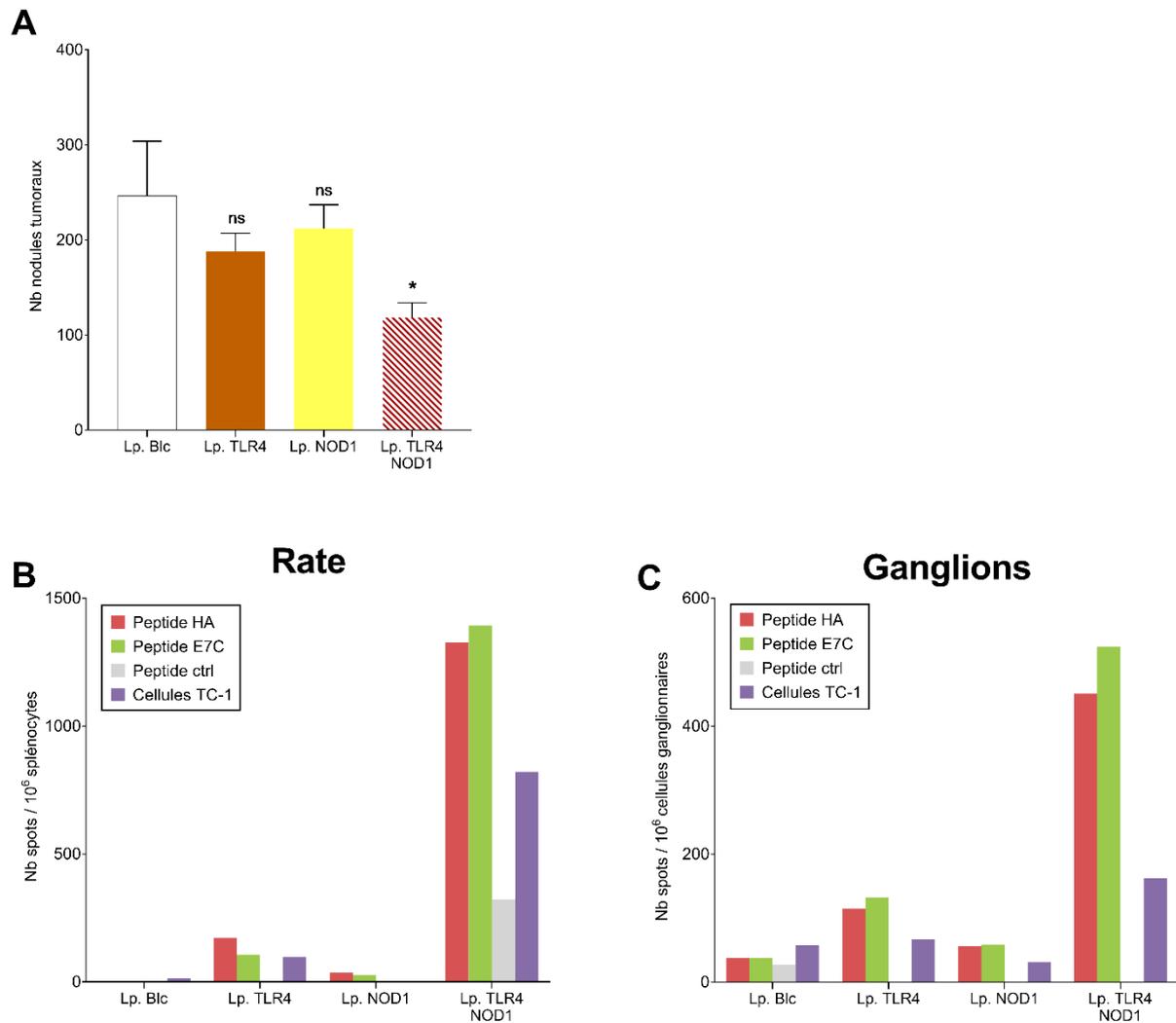


Figure 28. Efficacité thérapeutique de l'association d'agonistes du TLR4 et/ou de NOD1.

(A) Activité antitumorale. Après une injection i.v. de 1×10^5 cellules TC-1, des liposomes ne contenant ni peptide ni adjuvants (lp. blc) ou des vaccins peptidiques contenant un agoniste du TLR4 et/ou de NOD1 ont été administrés aux jours 14 et 16. 28 jours après, les poumons ont été collectés et contrastés. La moyenne \pm SEM du nombre de nodules par poumons est représentée ($n=5$). Les différences statistiques ont été calculées par un test d'analyse de la variance à un facteur (ANOVA), * $p < 0.05$. **(B-C) Réponse immunitaire.** Au jour 28, la rate **(B)** et les ganglions lymphatiques axiaux et inguinaux drainants la zone d'injection **(C)** ont également été récupérés et poolés par groupe de traitement. Le nombre de cellules produisant de l'IFN- γ a été mesuré par ELISpot après 24h d'incubation en présence des peptides HA, E7C, contrôle ($10 \mu\text{g/mL}$) ou des cellules TC-1 (125×10^3 cellules/mL). L'histogramme représente le nombre de spots/ 10^6 cellules ($n=1$).

observation peut s'expliquer car les vaccinations (ici à 14 et 16 jours) étaient plus proches de la date de récupération des organes immunitaires (28 jours). La réponse immunitaire primaire contre l'épitope CD4, qui dure environ 10 jours, était donc encore visible dans cette expérience contrairement aux autres études où les injections étaient plus précoces.

Enfin, nous avons vérifié la polarisation de la réponse immunitaire en analysant la production de cytokines par les cellules immunitaires des souris vaccinées (**Figure 30**). Les liposomes contenant un seul adjuvant n'ont pas induit de production de cytokines lorsqu'ils étaient injectés à ce stade tardif de développement tumoral, à l'exception d'une forte production d'IL-6 en présence des cellules TC-1. Cette production étant également observée avec le groupe contrôle, nous avons postulé que la présence des cellules TC-1 dans les plaques de culture devait induire une réaction aspécifique ayant pour

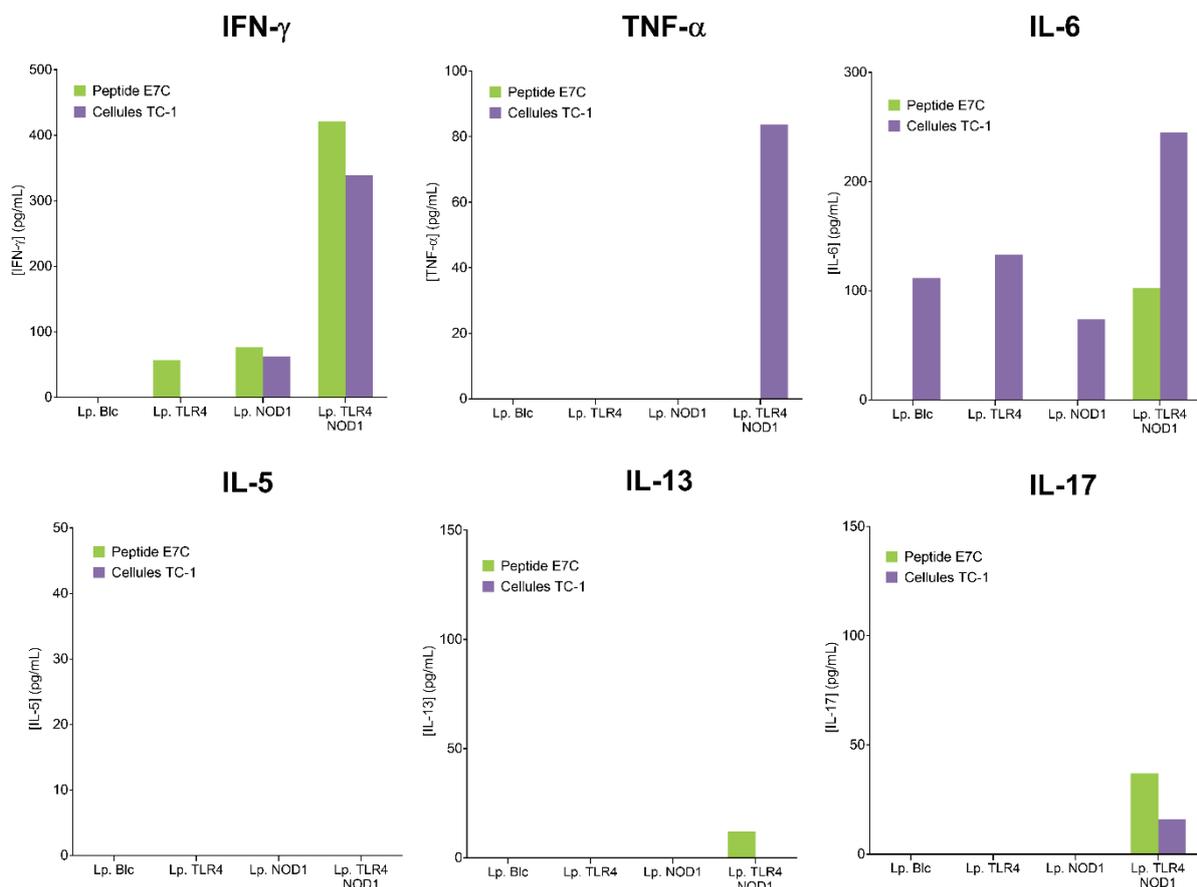


Figure 29. Production de cytokines par les splénocytes de souris vaccinées par des liposomes contenant un agoniste du TLR4 et /ou de NOD1.

Les suspensions de splénocytes préparées à partir des rate de souris vaccinées aux jours 8 et 10 ont également été analysées dans des tests ELISA. Les splénocytes ont été mis en culture pendant 72h en présence du peptide E7C (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou des cellules TC-1 (125×10^3 cellules/mL). Le milieu de culture a ensuite été analysé par ELISA afin de mesurer la production d'IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-5, IL-13 et IL-17

conséquence la production d'IL-6. Par contre, le traitement liposomes TLR4-NOD1 a permis l'induction d'une forte production d'IFN- γ en réponse au peptide E7C et aux cellules tumorales ainsi qu'un relargage de TNF- α et d'IL-6 en présence des cellules TC-1. Aucun des vaccins n'a induit de production d'IL-5 ou d'IL-13. Le vaccin contenant les deux adjuvants semble donc induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1 (IFN- γ et TNF- α), qui est associée à une forte efficacité thérapeutique contre les tumeurs pulmonaires.

D. Discussion

Lors de cette partie nous avons souhaité améliorer l'efficacité thérapeutique de nos vaccins peptidiques en associant des agonistes des TLR et NLR dans les liposomes et en évaluant leur effet dans un modèle murin de tumeurs orthotopiques pulmonaires. Des précédentes études *in vitro* ont montré le fort potentiel synergique résultant de l'activation de ces deux familles de PRR (Chamaillard et al. 2003; Tada et al. 2005; Fritz et al. 2007). Nous avons donc évalué l'association des adjuvants précédemment étudiés dans ce manuscrit aux liposomes : l'agoniste de NOD1 (C12iEDAP) avec un agoniste du TLR2/6 (Pam₂CAG) ou du TLR4 (MPLA).

Ces expériences ont montré que l'agoniste de NOD1 combiné à celui du TLR2/6 inhibait la réponse immunitaire alors que l'association des agonistes de NOD1 et du TLR4 active, de façon synergique, une réponse immunitaire antitumorale de type Th1, efficace contre un stade tardif de développement tumoral. Jusqu'à présent, seule l'association d'un agoniste de NOD2 et du TLR2 avait montré des effets contradictoires *in vivo* pouvant avoir un effet suppressif, additif ou synergique en fonction des expériences (Strober et al. 2006). Notre étude confirme donc l'importance du choix des combinaisons d'adjuvants, pouvant avoir un effet bénéfique ou délétère sur l'efficacité des vaccins antitumoraux. Dans le cas de l'association entre les agonistes de NOD1 et du TLR4, nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer leur effet synergique. D'une part, ces deux adjuvants pourraient se lier à leurs récepteurs respectifs exprimés par une même DC. Cette interaction activerait de manière synergique la voie de signalisation NF- κ B pour induire une maturation optimale des DC et une meilleure cross-présentation des épitopes peptidiques portés par le liposome (cf. §A.3, Introduction). D'autre part, l'agoniste de NOD1 pourrait activer préférentiellement des lymphocytes de l'immunité innée (NK ou NKT) comme supposé dans le **Chapitre 2**. La co-administration d'agonistes de NOD1 et du TLR4 permettrait donc de stimuler simultanément l'immunité innée et adaptative cytotoxique, induisant ainsi un effet antitumorale synergique. Concernant l'inhibition de la réponse immunitaire par les agonistes du TLR2/6 et de NOD1, l'inflammation observée avec des fortes doses d'adjuvants laisse entendre que la co-stimulation de ces récepteurs induit un recrutement trop important de cellules de l'immunité innée sur la zone d'injection. Afin d'éviter que ce traitement soit phagocyté et éliminé par d'autres cellules que les DC, il pourrait être envisagé de diminuer davantage les doses d'adjuvants.

Pour mieux comprendre les différences d'activité entre l'association du TLR2 ou du TLR4 avec NOD1, il serait intéressant d'étudier les acteurs immunitaires mis en jeu et les voies de signalisation activées dans les cellules dendritiques par nos vaccins, en analysant notamment la voie de Myd88 et RIP2 chez les DC, ainsi qu'en comparant l'expression des gènes suite à la double-stimulation des récepteurs et leur régulation par le facteur NF- κ B. Ces résultats préliminaires doivent cependant être reproduits pour confirmer les différences d'action de ces deux associations d'agonistes.

Bien que les récepteurs TLR2 et TLR4 soient tous deux membranaires et partagent majoritairement la même voie de signalisation (Myd88), ils seraient également intéressant de vérifier si les deux agonistes Pam₂CAG et MPLA peuvent être associés pour améliorer l'efficacité vaccinale. Des études *in vitro* ont déjà montré une synergie d'action entre ces deux récepteurs chez des DC et macrophages murins, qui produisent une plus grande quantité de TNF- α suite à la stimulation du TLR2 et TLR4 (Beutler et al. 2001; Mitchell et al. 2010). L'association d'une trop grande quantité d'agonistes ou la stimulation asynchrone de ces récepteurs peut cependant résulter en une tolérance aux agonistes, c'est pourquoi la quantité d'agonistes et leur formulation dans les liposomes devront être étudiés attentivement (Sato et al. 2000).

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

Sans **changement**, le **progrès** est impossible.

Walt Disney

Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'immunothérapie a émergé comme une alternative innovante pour compléter l'arsenal thérapeutique de traitements contre le cancer. Cette stratégie contourne la plupart des désavantages des traitements standard (chimiothérapie et radiothérapie) en exploitant la capacité innée et spécifique du système immunitaire à éliminer les tumeurs. Parmi les différents types de stratégies immunothérapeutiques, les vaccins antitumoraux sous-unitaires, composés d'épitopes peptidiques dérivés de TAA, ont montré des résultats prometteurs dans de nombreux modèles précliniques. Cependant, peu d'essais cliniques évaluant ce type de traitements ont atteint leurs objectifs cliniques en termes d'efficacité et de persistance de la réponse (Vacchelli et al. 2012a). Ces faits soulignent le besoin d'améliorer le développement de vaccins et de trouver des méthodes d'évaluations précliniques plus prédictives et fiables.

Pour aborder ce problème, l'objectif de ce projet de thèse a été de développer une stratégie de conception vaccinale, en employant une plateforme liposomique modulable. Cette plateforme vaccinale nous a permis : i) d'optimiser la composition vaccinale et d'évaluer différentes associations d'épitopes-adjuvants, ii) de comparer l'efficacité de plusieurs constructions à des calendriers d'injections différents et iii) d'identifier les mécanismes d'action et les cellules immunitaires requis pour l'efficacité des vaccins.

A. Plateforme et stratégie de conception vaccinale

1. Propriétés physicochimiques et production des vaccins

L'intérêt majeur des liposomes est leur grande versatilité, qui leur permet de vectoriser des composants vaccinaux ayant des propriétés physicochimiques différentes. Les caractéristiques intrinsèques des liposomes (taille, charge de surface, composition lipidique) sont également modulables et ont un grand impact sur leur interaction avec le système immunitaire (Tandrup Schmidt et al. 2016).

Un cahier des charges, définissant les propriétés générales de nos formulations, a été établi afin de s'assurer de l'uniformité de nos constructions liposomiques, pour que seule la variation de composition en peptides et adjuvants affecte l'efficacité des vaccins (**Tableau 8**). Pour chacune des formulations vaccinales présentées dans ce manuscrit, le cahier des charges a été respecté : les liposomes avaient une taille inférieure à 100 nm, un potentiel zêta négatif et les suspensions liposomiques étaient homogènes, contenant

une seule population de taille de distribution étroite. De plus, la conjugaison des peptides et la congélation des liposomes n'ont pas induit d'importantes variations de taille ou de charge de surface. Concernant la stratégie de conjugaison des peptides sur l'ancre maléimide (DPGmal), cette méthode a auparavant été montrée comme étant plus efficace que la technique d'encapsulation dans notre équipe (Frisch et al. 1991) et a prouvé son efficacité pour la délivrance de peptides tumoraux en vaccination (Roth et al. 2004; Heurtault et al. 2009; Thomann et al. 2011; Kakhi et al. 2016).

L'uniformité observée entre nos différents lots de constructions liposomiques prouve que notre méthode de formulation et de conjugaison peptidique est reproductible. L'impact des variations inhérentes aux différences entre lots de formulations a donc été minimisé, permettant de s'assurer que les résultats des différentes formulations, observés lors de l'évaluation *in vivo* des vaccins, étaient exclusivement dépendants des éléments vaccinaux ajoutés aux liposomes. A l'avenir, étudier l'influence des propriétés physicochimiques (diamètre, charge, lamellarité) d'un nombre limité de constructions vaccinales sur la réponse immunitaire, pourrait être une stratégie d'optimisation. Une autre piste à explorer serait d'évaluer la possibilité d'utiliser ces vaccins liposomiques suivant d'autres voies d'administrations, notamment des voies non invasives (voies transcutanée ou orale).

La méthode de formulation que nous avons choisie a cependant comme désavantage d'être difficilement industrialisable car elle nécessite l'utilisation de petits volumes (>2 mL) pour l'étape de sonication et comporte plusieurs étapes. Afin d'industrialiser ce type de production, il serait nécessaire d'employer d'autres techniques de formulation telles que l'injection d'éthanol ou la microfluidisation, qui sont des méthodes rapides, peu coûteuses et qui permettent la formulation de SUV en quantités importantes (Maherani et al. 2011; Worsham et al. 2018). Actuellement, nous possédons au laboratoire un microfluidiseur qui pourrait être utilisé pour préparer de gros volumes de SUV contenant l'ancre DPGmal, sur lesquels les peptides seront conjugués lors d'une seconde étape. Les quantités utilisées dans le projet ainsi que les changements fréquents de composition de nos constructions ne permettraient pas l'utilisation de cette technologie qui engendre beaucoup de perte lorsque des petits volumes sont utilisés. Le procédé de microfluidisation pourrait cependant être optimisé pour permettre notamment une grosse production de la construction « Liposomes TLR4 », notre vaccin le plus prometteur.

2. Stratégie de conception vaccinale

Un des premiers objectifs de ce projet était de démontrer la versatilité de notre approche vaccinale antitumorale, qui avait auparavant été uniquement employée dans un modèle de tumeurs ectopiques Renca-ErbB2 chez les souris BALB/c. Pour cela, nous avons souhaité développer de nouveaux vaccins thérapeutiques contre un modèle orthotopique de tumeurs pulmonaires transformées par le papillomavirus humain : les cellules TC-1 injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6J (Lin et al. 1996).

Dans la littérature ainsi qu'auparavant au laboratoire, les vaccins (contenant les épitopes et les adjuvants) ont souvent été évalués directement avec leur composition finale, sans connaître l'impact individuel de chaque constituant sur l'efficacité du vaccin. Afin de répondre à ce problème, nous avons développé une stratégie de sélection qui exploite le liposome comme une plateforme où chacun des trois éléments vaccinaux a été ajouté de manière séquentielle dans les vaccins avant que leur immunogénicité ne soit évaluée dans des souris saines (**Figure 31**). Ainsi, lors de différentes étapes de criblage (**Chapitre 1**), deux épitopes CD4 universels, deux épitopes CD8 et trois agonistes des TLR ou des NLR (adjuvants) ont ainsi été comparés, permettant le développement de trois vaccins liposomiques efficaces contre ce nouveau modèle tumoral.

Outre la possibilité d'optimiser indépendamment la composition et la dose de chaque élément immunitaire et de comparer l'association d'épitope(s) et d'adjuvant, l'intérêt majeur de cette stratégie est également sa facilité et rapidité d'exécution. En effet, l'évaluation de vaccins dans des souris portant des tumeurs est un protocole plus long et hasardeux qu'une évaluation dans des souris saines immunisées. Il était également intéressant d'étudier l'effet de nos traitements dans une souris saine, l'immunogénicité d'un vaccin pouvant être biaisée en présence d'une tumeur. Il a d'ailleurs été proposé par une convention internationale, « The Human Vaccines Project », de vacciner régulièrement des individus sains pour comparer l'effet d'un traitement en présence d'un système immunitaire optimal par rapport à ceux obtenus chez des patients atteints de cancer (Romero et al. 2016). Ces données peuvent apporter des informations concernant les critères et freins immunitaires devant être contournés pour améliorer l'efficacité de vaccins thérapeutiques.

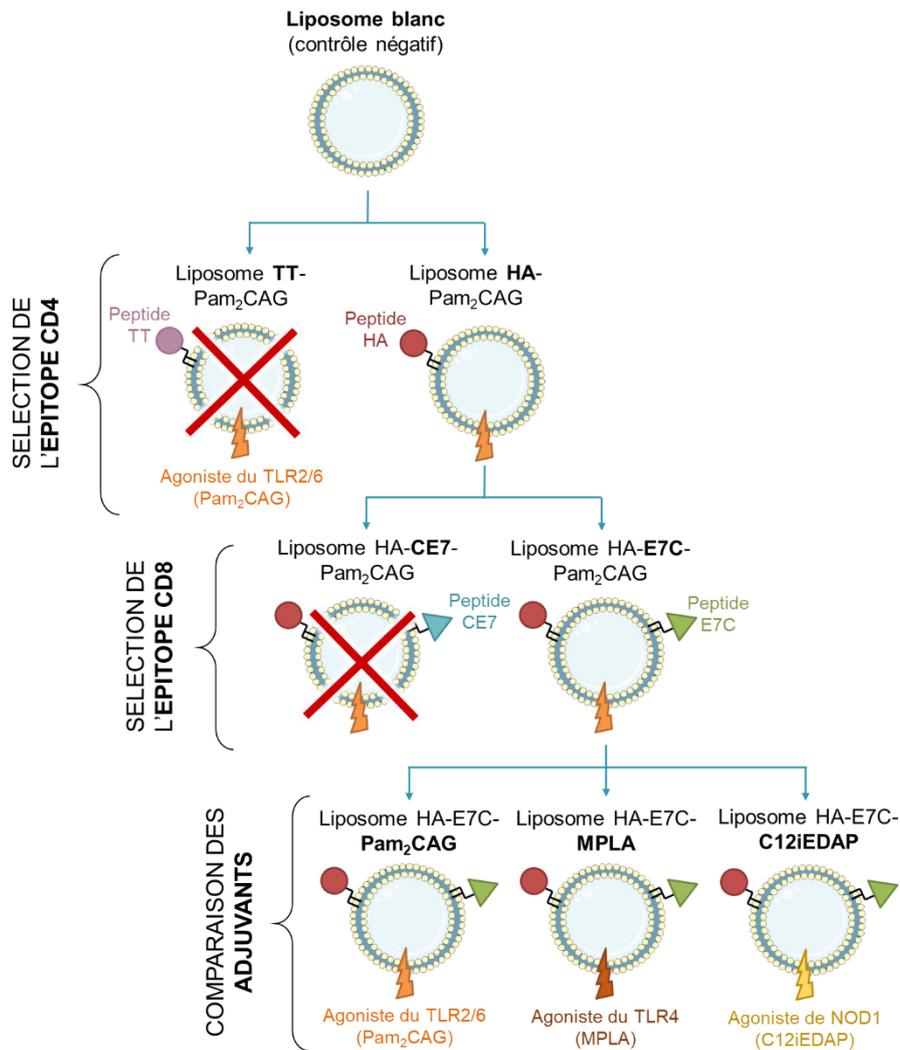


Figure 30. Résumé des différentes formulations développées lors du Chapitre 1.

Cette figure représente la stratégie de conception vaccinale qui a été employée pour développer les vaccins « complets » qui ont été analysés lors du **Chapitre 2**.

3. Importance de la sélection des peptides

Grâce à cette stratégie de sélection, nous avons éliminé de notre étude les constructions contenant le peptide TT (épitope CD4) et le peptide CE7 (épitope CD8) qui ne permettaient pas d'induire une réponse immunitaire spécifique, détectable par ELISpot. Ceci souligne l'importance d'évaluer selon une méthode empirique les épitopes vaccinaux. Bien qu'étant décrits comme antigéniques dans la littérature, certains peptides peuvent s'avérer inefficaces dans d'autres modèles tumoraux à cause, notamment, des variations d'allèles du CMH entre les souris (O'Sullivan et al. 1991; Crowe et al. 2006).

Nous avons émis l'hypothèse lors du **Chapitre 1** que l'absence d'antigénicité du peptide TT pouvait être due à une mauvaise association au CMH-II des souris C57BL/6J (I-A^b), comme cela avait déjà été montré précédemment (Alexander et al. 1994). Cependant, nous avons récemment montré que le peptide TT était en réalité cytotoxique *in vitro*. En effet, l'incubation de splénocytes avec ce peptide pendant plus de 24h a engendré une forte mortalité cellulaire, mesurée par marquage avec de l'iodure de propidium suivie d'une analyse par cytométrie en flux (données non présentées). Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à l'antigénicité du peptide TT dans les souris C57BL6J. L'utilisation de ce peptide reste malgré tout problématique car, même s'il pouvait être un bon activateur *in vivo*, nous sommes dans l'incapacité d'évaluer son effet sur le système immunitaire *in vitro*, lors de tests ELISpot ou ELISA.

Finalement, nous avons également montré qu'il est nécessaire de vérifier que l'antigénicité d'un peptide n'est pas altérée lors de la modification ou l'addition d'un résidu dans la séquence peptidique, comme cela avait déjà été soulevé par d'autres équipes (Moudgil et al. 1998; Chen et al. 1999) (peptide E7, **Chapitre 1**).

B. Calendrier de vaccination et stade de progression tumorale

1. Stade avancé de progression tumorale

Lors du **Chapitre 1**, nous avons conclu que les trois vaccins liposomiques conçus grâce à notre stratégie de sélection avaient une efficacité antitumorale équivalente sur des tumeurs précoces, bien qu'ayant des compositions en adjuvants différentes. Cependant, en décalant les injections des traitements par rapport au temps d'implantation des tumeurs, d'importantes différences d'efficacité ont été mises en évidence (**Chapitre 2**). En vaccination antitumorale, le traitement prophylactique est difficilement envisageable mis à part pour les tumeurs d'origine virale ou certaines formes « monogéniques » de mutations induisant une forte prédisposition à développer une tumeur (Finn 2018). C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés à la vaccination thérapeutique antitumorale. Probablement en raison des difficultés à atteindre une efficacité, de nombreuses études de vaccins dits « thérapeutiques » évaluent l'efficacité des traitements à des stades très précoces du développement de la tumeur. Il est cependant indispensable d'évaluer également l'efficacité des vaccins candidats contre des stades plus avancés de croissance tumorale, se rapprochant plus de l'idée que la détection d'une tumeur chez l'Homme a lieu lorsque la tumeur est déjà établie.

Ce décalage du calendrier d'injection, combiné à une analyse de la survie des souris, nous a permis de montrer un cas d'efficacité très atypique suite au traitement avec les liposomes contenant un agoniste de NOD1 (**Chapitre 2**). Une administration tardive de ce traitement (12 jours après l'injection des cellules tumorales) semble induire une très forte réduction de la croissance tumorale lorsque l'analyse est réalisée par comptage des nodules pulmonaires au jour 28. Pourtant, ce même traitement administré au jour 12, ne permet pas d'allonger la survie des souris qui meurent aussi rapidement que les animaux ayant reçu le traitement contrôle. Nous aurions donc conclu à une efficacité similaire entre les liposomes NOD1 et TLR4 si nous nous étions uniquement contentés d'évaluer la croissance tumorale à un temps arbitraire.

Afin de suivre plus directement la croissance tumorale pulmonaire et l'effet des traitements, il serait désormais intéressant de travailler avec des cellules tumorales luminescentes pouvant être détectées par imagerie dans des animaux anesthésiés. Par exemple, la lignée cellulaire TC-1 utilisée dans ce manuscrit existe sous la forme TC-1/Luc

où les cellules ont été transfectées avec un rétrovirus contenant un plasmide codant pour l'expression de la luciférase (Chang et al. 2007). Cette enzyme exprimée constitutivement par les cellules réagit avec la luciférine injectée par voie i.p. pour donner un produit luminescent. Cette méthode a déjà été employée pour le suivi de tumeurs s.c. ou situées au niveau du cou, des poumons et du vagin (Touati et al. 2014; Bartkowiak et al. 2015; Mondini et al. 2015).

2. Calendrier vaccinal

Un autre point à améliorer pour optimiser le traitement avec les liposomes vaccinaux est de modifier le calendrier d'injection. Dans ce manuscrit, deux doses de vaccins thérapeutiques étaient administrées aux souris à un intervalle de deux jours entre elles. Cependant, il pourrait être envisagé de réaliser plus de répétitions vaccinales, car il a été montré que des injections répétées de vaccins induisaient un maintien de l'activation des DC, une plus grande différenciation des CTL (Johansen et al. 2008) et augmentaient l'ampleur et la diversité de la réponse immunitaire cytotoxique (Aly 2012). Dans le cas du Sipuleucel-T® (vaccin thérapeutique contre le cancer de la prostate) et du Gardasil® ou Cervarix® (vaccins préventifs contre le cancer du col de l'utérus), il a été recommandé d'administrer ces vaccins en trois doses, lors de leur mise sur le marché (Mishra et al. 2015).

De plus, l'intervalle que nous avons choisi entre les deux injections pourrait ne pas être idéal pour favoriser le développement d'une réponse immunitaire mémoire efficace. En effet, pour les vaccins préventifs évalués sur la souris, il est conseillé d'attendre que le nombre de CTL spécifiques circulants ait diminué de plus de 90% pour effectuer un rappel, soit plus de 3 semaines (Knudsen et al. 2014; Stark et al. 2016). Dans le cas des vaccins antitumoraux thérapeutiques, la littérature est cependant partagée concernant l'intervalle de temps optimal entre deux injections. Certains essais cliniques ont démontré que l'injection de plusieurs doses de vaccins permettait de booster la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène, alors que d'autres études n'ont pas montré d'amélioration clinique après la seconde administration du vaccin (Church et al. 2011; Ricupito et al. 2013). D'autres études systématiques, associées à un meilleur suivi de la réponse immunitaire chez les patients, devraient être réalisées pour réussir à prévoir dans quel(s) cas plusieurs injections de vaccins thérapeutiques seraient nécessaires.

C. Suivi de la réponse immunitaire

La majorité des revues récentes, traitant des enjeux pour le développement de vaccins thérapeutiques, s'accorde à dire qu'un paramètre important à améliorer lors des essais cliniques et précliniques est le suivi de la réponse immunitaire (Guo et al. 2013; Butterfield 2015; Romero et al. 2016). En effet, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action d'un vaccin et d'étudier les éléments immunitaires pouvant permettre de prévoir l'échec ou la réussite d'un traitement. L'ensemble de ces paramètres est appelé « *immunoscore* » (Angell & Galon 2013; Galon et al. 2013; Farsaci et al. 2016).

Dans le **Chapitre 2**, nous avons démontré que le traitement Liposomes TLR4 était le vaccin le plus efficace parmi les trois constructions évaluées. Nous avons également approfondi l'analyse de la réponse immunitaire antitumorale induite par ce vaccin. Ceci nous a permis de déterminer un mécanisme d'action hypothétique retraçant la série d'évènements déclenchés suite à son administration, représenté dans la **Figure 32**.

Suite à l'injection s.c. de ce vaccin, la sous-population dermique de cellules dendritiques CD103⁻ (cDC2) va internaliser la construction vaccinale par endocytose passive ou selon un mécanisme actif par liaison du MPLA sur le TLR4 (Chaturvedi & Pierce 2009). Pendant leur migration jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants la zone d'injection, les DC vont devenir matures et entreprendre un processus de cross-présentation des épitopes peptidiques présents dans le vaccin. Cette sous-population de DC, peu décrite comme étant spécialisée dans la cross-présentation, peut aussi transporter les antigènes jusqu'aux ganglions puis les transférer aux CD8α⁺ DC (cDC1) par un mécanisme appelé « *cross-dressing* » (Allan et al. 2006). Les peptides HA et E7 seront associés aux molécules du CMH et présentés aux lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ respectivement, ce qui conduit à leur différenciation en Th1 et CTL. Ces deux sous-types cellulaires produisent une grande quantité d'IFN-γ favorisant le maintien d'une réponse immunitaire antitumorale. Finalement, les CTL spécifiques du peptide E7 seront capables de reconnaître et détruire spécifiquement les cellules TC-1, présentes dans les poumons, qui expriment cet antigène.

Cette étude mécanistique nous a permis de montrer l'impact du traitement Liposomes TLR4 sur les trois cellules immunitaires du « ménage à trois » et de prouver leur importance dans l'efficacité vaccinale. Seule la déplétion des cellules CD4 ne nous a pas

permis de conclure clairement quant à l'importance du peptide HA dans nos constructions, en tant qu'agent de différenciation des Th1 (**Chapitre 2**). Cependant, il avait déjà été montré précédemment dans le modèle Renca-ErbB2 exploité au laboratoire, qu'une construction vaccinale était moins efficace si elle contenait uniquement l'épitope CD8, en terme de survie des souris (Roth et al. 2005).

Dans le cas des liposomes NOD1, nous avons émis l'hypothèse que ce traitement semblait activer une réponse innée, ne permettant pas une efficacité à long terme du vaccin. Il serait donc intéressant d'étudier quels autres sous-types cellulaires sont impliqués dans l'activité antitumorale, en réalisant par exemple une déplétion sélective ou en utilisant des modèles de souris transgéniques déficientes pour les lymphocytes NK, NKT ou $T\gamma\delta$.

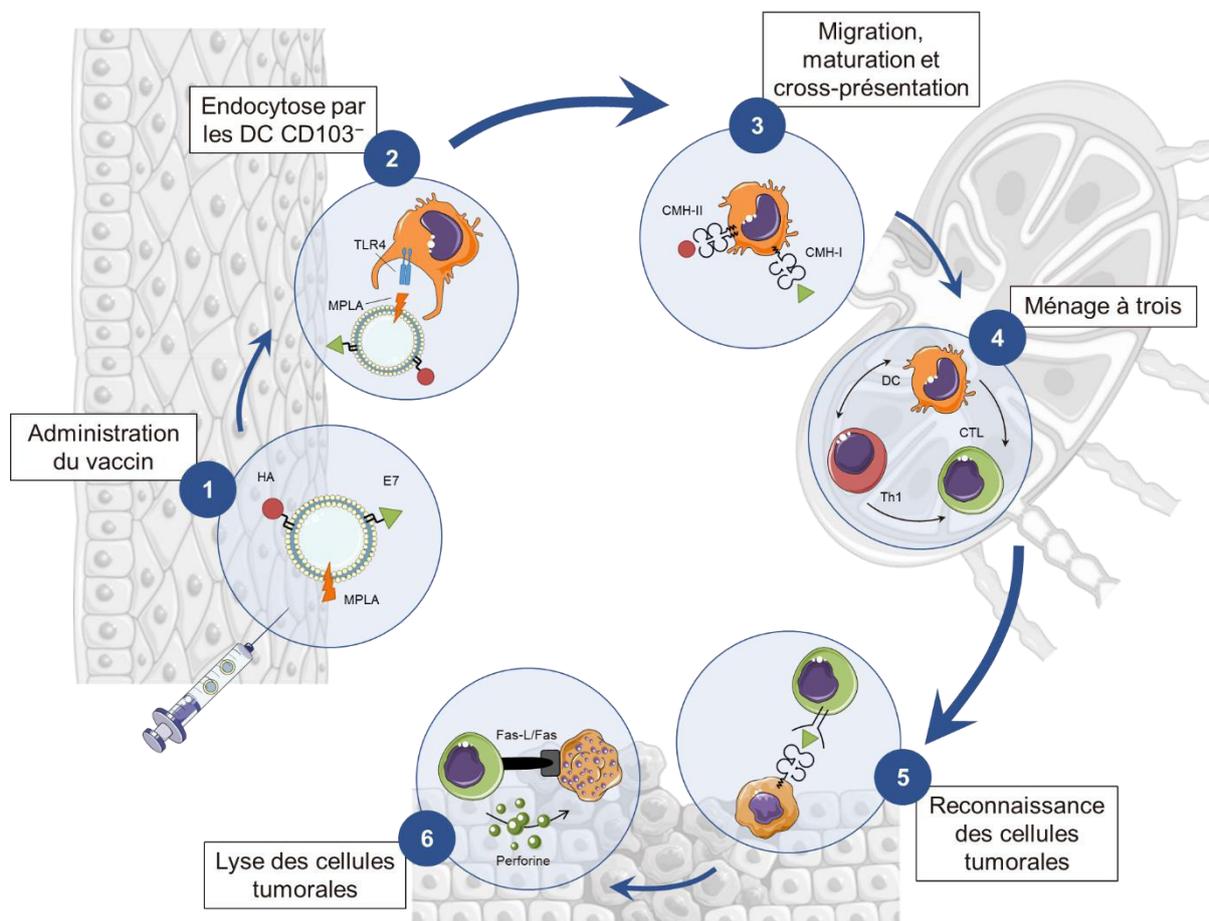


Figure 31. Mécanismes hypothétiques d'action des liposomes TLR4.

Les liposomes TLR4 administrés par voie s.c. (1) sont endocytés par les DC du derme de type CD103⁻ (2). Le ligand du TLR4 va induire la maturation de la DC, suivie de leur migration et cross-présentation des épitopes peptidiques vectorisés par les liposomes (3). Ces épitopes seront présentés sur le CMH aux lymphocyte T pour induire leur différenciation en Th1 et CTL (4). Les CTL vont ensuite reconnaître le peptide E7 présenté à la surface des cellules TC-1 (5) et induire leur mort par apoptose (6).

Pour poursuivre l'étude mécanistique de ces trois liposomes vaccinaux, il pourrait également être intéressant de corréler l'efficacité des vaccins avec une mesure de l'infiltration immunitaire au niveau de la tumeur. En effet, chez l'Homme et la souris, la présence de lymphocytes infiltrants (LIT) CTL et Th1 ou la diminution de Treg sont souvent associées à un bon pronostic de régression tumorale (Fridman et al. 2012). Le statut effecteur ou mémoire des lymphocytes T spécifiques de la tumeur est également un facteur important pouvant permettre de prédire l'efficacité à long terme d'un traitement ainsi que le risque de récurrence ou de métastases chez les patients (Jia et al. 2015; Reiser & Banerjee 2016). Il serait donc intéressant d'analyser la présence de lymphocytes T effecteurs mémoires (CD45RO⁺ CD44⁺ CD62L⁻) parmi les lymphocytes circulants ou les LIT.

D. Optimisation des formulations vaccinales

1. Synergie des agonistes des TLR ou NLR

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons évalué l'association à une même nanoparticule liposomique de deux adjuvants des TLR ou NLR parmi les agonistes du TLR2/6, TLR4 et NOD1. Nous avons montré que l'agoniste de NOD1 pouvait avoir un effet synergique ou délétère pour la réponse immunitaire en fonction de l'agoniste des TLR avec lequel il était associé (TLR4 ou TLR2/6, respectivement). En plus d'évaluer l'association des deux agonistes du TLR, comme proposé dans la discussion du **Chapitre 3**, il serait également intéressant d'étudier quels sous-types immunitaires sont ciblés par les liposomes contenant deux agonistes des PRR *in vivo*. En effet, en plus de déclencher un changement de polarisation de la réponse immunitaire (Fritz et al. 2007), l'association de deux adjuvants peut également aider à l'activation d'autres acteurs immunitaires tels que les NKT (Selvanantham et al. 2013). Pour aller plus loin dans la compréhension des interactions entre les voies de signalisation induites par le TLR4 et NOD1, les liposomes contenant les deux adjuvants pourraient être employés pour vacciner des souris RIP2-KO, afin de vérifier l'hypothèse, pour le moment controversée, de l'implication de cette protéine dans la synergie entre ces deux récepteurs (Lu et al. 2005) (**Figure 22**).

2. Ciblage des cellules dendritiques

Dans notre équipe, il avait été proposé d'ajouter un ligand mannosylé synthétique (Man₂DOG) dans les vaccins liposomiques, afin d'augmenter le ciblage des DC, qui expriment des récepteurs au mannose (**Figure 12**). L'addition du Man₂DOG dans un vaccin liposomique a induit une forte réponse antitumorale dans des souris portant des tumeurs s.c. Renca-ErbB2 (Thomann et al., 2011). L'association de ce ligand a également permis de diminuer les quantités optimales d'agoniste du TLR2/6 (Pam₂CAG) et de peptides nécessaires à l'efficacité du traitement. De la même manière, il a déjà été montré par une autre équipe que l'association, dans des nanoparticules de PLGA mannosylés, d'agonistes du TLR3, TLR9 et d'épitopes CD4 et CD8 induisait une importante régression de la croissance tumorale dans des souris portant des mélanomes (Silva et al. 2015). Il pourrait donc être intéressant d'ajouter le Man₂DOG dans nos formulations contenant un ou deux agonistes des TLR ou NLR, afin d'essayer d'augmenter d'avantage la limite temporelle d'efficacité de nos vaccins.

E. Les enjeux de la vaccination thérapeutique

1. Quels sont les freins à la vaccination contre le cancer ?

Dans le chapitre d'**Introduction**, nous avons abordé différents inconvénients de l'immunothérapie, perçus comme des freins par la communauté scientifique, qui expliquent pourquoi cette stratégie innovante est encore peu reconnue comme un traitement de routine contre le cancer. Ces inconvénients sont : le risque d'auto-immunité, de sélection de cellules tumorales résistantes et la faible efficacité des traitements contre des tumeurs de stade avancé ou métastasé.

En dehors des réticences de certains médecins et scientifiques, un des freins majeurs à la vaccination thérapeutique est l'opinion publique et la perte de confiance en la vaccination, observées ces dernières années (Black & Rappuoli 2010; Larson et al. 2016). En effet, même les vaccins préventifs employés depuis plus de 100 ans, subissent une vague de scepticisme concernant leur nécessité et leur efficacité. Une étude montrant une corrélation entre l'autisme et le vaccin contre la rougeole, les oreillons et la rubéole a fortement contribué à l'émergence de nouvelles inquiétudes concernant les vaccins (Gross 2009; Opel et al. 2011). Malgré le fait que cette étude ait été discréditée et que l'article ait été rétracté pour fraude scientifique, de nombreuses « théories du complot » antivaccins perdurent (Jolley & Douglas 2014), alimentées par des campagnes de désinformation sur internet et les réseaux sociaux (Ward et al. 2016).

En dépit d'une amélioration des méthodes de formulations vaccinales et un meilleur contrôle-qualité de la sûreté des vaccins, l'opinion générale concernant la vaccination reste divisée (Larson et al. 2016). Aujourd'hui, un enjeu majeur est de regagner la confiance du public, réaffirmer la nécessité de la vaccination et mieux définir la balance bénéfice/risque de chaque vaccin. Les institutions de santé publique et les industries pharmaceutiques doivent se coordonner afin d'avoir un discours commun crédible, pédagogique et rassurant. Idéalement, pour chaque nouvelle formulation vaccinale et nouveaux adjuvants mis sur le marché, les médecins et experts du domaine devront être en mesure d'expliquer simplement le fonctionnement du traitement, sa composition, sa nécessité et son respect des normes de qualité et de sécurité.

L'utilisation de nanovecteurs vaccinaux et leur innocuité sont également des préoccupations qui devront être abordées dans les années à venir (Thomas et al. 2006). En effet, l'opinion publique craint également les nanoparticules, qui est une technologie relativement récente, pour laquelle nous possédons à l'heure actuelle peu de recul concernant le risque qu'elle représente pour la santé ou l'environnement (Stern & McNeil 2008). Les scientifiques doivent continuer à accumuler des données concernant la sûreté de ce type d'objets et développer de nouvelles méthodes de mesure de leur impact toxicologique. Il est également important de ne pas généraliser le risque d'exposition aux nanoparticules, chaque type de nanomatériaux devant être considéré individuellement, leur composition et leur méthode d'administration pouvant grandement influencer une éventuelle toxicité (Yildirimer et al. 2011)

Malgré une opinion publique qui n'est pas unanimement favorable aux vaccins et la réticence de certains patients à être soignés par de nouvelles thérapies pour lesquelles nous avons moins de recul, l'immunothérapie reste une stratégie thérapeutique d'avenir qui continuera à se faire une place parmi les thérapies classiques contre le cancer.

2. L'intérêt de combiner la vaccination avec d'autres immunothérapies

Suite à l'essor des thérapies « immune checkpoint » et CAR-T, la vaccination thérapeutique peine encore à faire ses preuves mais se fera sûrement une meilleure place parmi l'arsenal thérapeutique dans les années à venir. En effet, cette stratégie possède de nombreux avantages détaillés dans le chapitre d'**Introduction**, tels qu'une production simple et peu onéreuse, une plus grande spécificité et une facilité à mesurer son effet en surveillant le système immunitaire.

Comme discuté précédemment, la faible efficacité de l'immunothérapie contre des tumeurs solides peut être compensée en la combinant avec des traitements utilisés classiquement tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Au vu de la complexité de la réponse immunitaire antitumorale, l'association de deux stratégies immunothérapeutiques pourrait également permettre de cibler différents aspects de l'interaction entre le système immunitaire et la tumeur, afin d'augmenter l'efficacité et la durée de leur effet thérapeutique. En effet, différentes stratégies ont déjà été développées lors desquelles le patient reçoit premièrement un vaccin codant pour (ou portant) un TAA, suivi dans un second temps par une administration de molécules de co-stimulation, d'adjuvants seuls

ou de cytokines pour renforcer la réponse immunitaire initiée par le premier traitement (Guo et al. 2013). Il existe de nombreuses études précliniques montrant un effet additif ou synergique de vaccins combinés à l'injection de cytokines telles que l'IFN- α (Pace et al. 2010), le GM-CSF (Aarts et al. 2002) et l'IL-2 (Dalglish 2015).

Une des raisons pouvant expliquer la faible efficacité clinique des vaccins serait l'existence de mécanismes immunosuppresseurs pré-existants ou renforcés par les traitements antitumoraux. Pour surmonter cet obstacle, il est nécessaire de combiner les vaccins avec des thérapies permettant de réduire l'environnement immunosuppresseur (Grenier et al. 2018). Les principales cibles cellulaires, tenues pour responsables dans les mécanismes immunosuppresseurs, sont les Treg. Des peptides inhibiteurs ou des anticorps monoclonaux déplétant des molécules exprimées par les Treg (Foxp3, GITR, CCR4) sont en cours d'évaluation dans des modèles précliniques et chez l'Homme, en association avec des vaccins peptidiques (Morse et al. 2008; Nishikawa & Sakaguchi 2014; Grenier et al. 2018). D'autres cellules immunosuppressives peuvent être ciblées, comme par exemple les macrophages associés à la tumeur ou les MDSC, leur déplétion permettant d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale (Srivastava et al. 2012; Dammeyer et al. 2017). Il est également possible de neutraliser le TNF- α , qui participe à l'activation et le maintien des fonctions immunosuppressives ou d'inhiber son récepteur pour réguler les Treg (Salomon et al. 2018).

L'association de vaccins avec des inhibiteurs des récepteurs « checkpoint » (@CTLA-4, ipilimumab ou @PD-1, nivolumab), exprimés par les cellules immunosuppressives ou la tumeur, est également une stratégie très étudiée depuis l'autorisation de mise sur le marché de ces anticorps monoclonaux. Cette combinaison a montré de très bons résultats dans des modèles tumoraux de mélanome, cancer du pancréas et du colon, permettant une plus grande infiltration de lymphocytes T fonctionnels, une diminution du nombre de Treg dans la tumeur, une meilleure activité antitumorale et une augmentation de la survie des souris (Li et al. 2009; Curran et al. 2010; Duraiswamy et al. 2013; Soares et al. 2015). La sûreté de cette association a été démontrée dans deux essais cliniques de phase I (Weber et al. 2013; Gibney et al. 2015) et douze autres essais cliniques de phase I/II sont en cours de recrutement ou ont débuté (source : Clinicaltrials.gov). Ces études permettront de fournir de précieux renseignements concernant l'efficacité de cette association d'immunothérapies chez l'Homme.

La combinaison de la vaccination et de thérapies ciblant les mécanismes immunosuppresseurs semble donc être une stratégie évidente et prometteuse qui permettra de libérer pleinement le potentiel thérapeutique des vaccins antitumoraux.

3. Vaccins personnalisés et médecine adaptée

« Chaque jour, des millions de personnes prennent des traitements qui ne vont pas les aider » (Schork 2015). En effet, les dix médicaments en tête de vente aux Etats Unis permettent de soigner uniquement d'1/4 à 1/25^{ème} des patients qui les prennent. En thérapie contre le cancer, et notamment en vaccination, la majorité des études ont pour objectif de développer des vaccins dirigés contre un seul type tumoral, pouvant être utilisés pour tous les patients atteints de cette pathologie (Poland et al. 2011; De Gregorio & Rappuoli 2014). Les stratégies de développement vaccinal se dirigent désormais plutôt vers une conception stratégique et rationnelle des vaccins prenant en compte l'hétérogénéité inter-patient et intratumorale dans le but de développer des vaccins entièrement personnalisés à la tumeur et au patient.

En effet, l'identification de néoantigènes (antigènes réellement spécifiques de la tumeur) est désormais devenue plus simple grâce aux récents progrès en génomique et séquençage génétique (Cherryholmes et al. 2015; Aurisicchio et al. 2018). Ces avancées technologiques permettent l'identification rapide de mutations tumorales à partir de biopsies humaines directement au chevet du patient, ouvrant ainsi la voie vers le développement de vaccins personnalisés ciblant une ou plusieurs protéines tumorales (**Figure 11**). Les premiers essais cliniques de vaccination personnalisée ont déjà été entrepris et ont apporté la preuve de leur faisabilité, leur biocompatibilité et leur efficacité thérapeutique (Aurisicchio et al. 2018; Hu et al. 2018). L'utilisation de ce type de traitement reste cependant encore limitée à cause des problèmes de coûts, faisabilité, et rapidité du processus de séquençage et de fabrication du vaccin.

La stratégie que nous avons développée lors de ce projet pourrait représenter une option parallèle aux vaccins entièrement personnalisés. En effet, il pourrait être envisagé de développer une panoplie de plateformes liposomiques préformées, contenant différentes combinaisons d'épitope(s) CD4 universel(s) et d'agoniste(s) des PRR, ainsi que des fonctions d'ancrage peptidique non couplées pour permettre le rajout ultérieur de néoantigènes peptidiques séquencés à partir de biopsie tumorale. Ces vaccins semi-

personnalisés représenteraient une alternative intermédiaire aux anciens traitements classiques « prêts-à-l'emploi » et aux futures thérapies personnalisées « sur mesure et adaptées ». A notre connaissance, ce type de technologie n'a pour l'instant pas d'équivalent dans le domaine de la vaccination thérapeutique contre le cancer. La possibilité de choisir entre différentes associations d'épitopes et d'adjuvants s'intègre totalement au concept de la médecine personnalisée tout en apportant au médecin un outil vaccinal mieux caractérisé, plus facile d'emploi et ajustable. Ce type de technologie devrait bien sûr être couplé à une étude prédictive de la susceptibilité du patient à l'épitope CD4 universel (présence d'une immunité mémoire contre l'antigène due à une vaccination ou rencontre antérieure avec le pathogène) et à l'adjuvant (eg. niveau d'expression et distribution tissulaire des récepteurs au PRR).

En effet, un des principaux enjeux de la vaccination personnalisée, mais également de l'immunothérapie en général, est l'identification de marqueurs immunitaires permettant de prédire ou diagnostiquer l'efficacité d'un traitement (Butterfield 2015; Schumacher et al. 2015). Ces facteurs immunitaires pourraient être utilisés pour identifier les patients les plus susceptibles de bénéficier d'un type de vaccin, d'adjuvant ou même de combinaison de thérapies. Par exemple, le niveau d'expression des récepteurs « checkpoint » pourrait être mesuré dans les biopsies tumorales pour déterminer en avance si les vaccins devront être complétés par des injections d'inhibiteurs des mécanismes immunosuppresseurs. La détection d'un grand nombre de cellules tumorales ayant un défaut d'expression du CMH-I pourrait également être un signe prédisposant à l'utilisation de thérapies permettant l'activation des NK et NKT ou de traitements « classiques », qui ne sont pas dépendants d'une réponse immunitaire adaptative.

Une ambition de la médecine personnalisée serait également de pouvoir personnaliser les traitements antitumoraux, pas uniquement en début de protocole médical, mais également au cours de l'évolution de la tumeur et de la thérapie. Avec les récentes améliorations des technologies de séquençage, un meilleur suivi des biomarqueurs immunitaires et la future possibilité de suivre l'avancement d'une tumeur par analyse de marqueurs sanguins, les vaccins personnalisés pourraient bien devenir une des premières stratégies thérapeutiques qui cible « le bon patient » avec « le bon médicament » au « bon moment ».

4. Le vaccin idéal

En répondant aux différents enjeux de la vaccination thérapeutique contre le cancer, nous pouvons espérer dans les vingt prochaines années assister à l'émergence de traitements beaucoup plus efficaces, adaptés et spécifiques : les vaccins personnalisés. Ces traitements seraient composés de néoantigènes séquencés à partir de la tumeur du patient et d'adjuvant(s) puissant(s) et non toxique(s). Un vaccin idéal sera en mesure i) d'induire la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ et de polariser une forte réponse immunitaire de type Th1, ii) de stimuler la maturation des DC et iii) de permettre la prolifération d'un grand nombre de CTL effecteurs ou mémoires spécifiques de la tumeur, pour permettre l'induction d'une réponse immunitaire cytotoxique puissante. Idéalement, ce vaccin devrait pouvoir être formulé rapidement, être stérile et être adaptable à chaque composant vaccinal, quel que soit ses propriétés physicochimiques.

Le défi futur de ce type de traitement sera de prouver son efficacité et sa faisabilité dans des phases d'essais cliniques plus avancés, en combinaison avec des traitements standard (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) ou des thérapies ciblant les mécanismes immunosuppresseurs. En dehors d'une amélioration technologique attendue en génomique et vaccinologie, le plus grand enjeu de ce type de traitement sera de répondre aux exigences économiques, sociétales et réglementaires concernant ces pratiques innovantes de fabrication, ainsi que son coût de production qui reste pour l'instant une limitation non négligeable.

BIBLIOGRAPHIE

** voir p.230*

A

Aarts, W.M., Schlom, J., and Hodge, J.W. (2002). Vector-based vaccine/cytokine combination therapy to enhance induction of immune responses to a self-antigen and antitumor activity. *Cancer Res.* *62*, 5770–5777.

Adamina, M., Guller, U., Bracci, L., Heberer, M., Spagnoli, G.C., and Schumacher, R. (2006). Clinical applications of virosomes in cancer immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *6*, 1113–1121.

Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1147–1157.

Aldous, A.R., and Dong, J.Z. (2018). Personalized neoantigen vaccines: A new approach to cancer immunotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* *26*, 2842–2849.

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.

Algarra, I., García-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *53*, 904–910.

Alizadeh, D., and Larmonier, N. (2014). Chemotherapeutic targeting of cancer-induced immunosuppressive cells. *Cancer Res.* *74*, 2663–2668.

Allan, R.S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y., Lew, A.M., Shortman, K., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* *25*, 153–162.

Allen, T.M., Hansen, C.B., and Guo, L.S. (1993). Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim. Biophys. Acta* *1150*, 9–16.

Allison, A.G., and Gregoriadis, G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* *252*, 252.

Alving, C.R., and Rao, M. (2008). Lipid A and liposomes containing lipid A as antigens and adjuvants. *Vaccine* *26*, 3036–3045.

Aly, H.A.A. (2012). Cancer therapy and vaccination. *J. Immunol. Methods* *382*, 1–23.

Amin, A., Benavides, L.C., Holmes, J.P., Gates, J.D., Carmichael, M.G., Hueman, M.T., Mittendorf, E.A., Storrer, C.E., Jama, Y.H., Craig, D., et al. (2008). Assessment of immunologic response and recurrence patterns among patients with clinical recurrence after vaccination with a preventive HER2/neu peptide vaccine: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *57*, 1817–1825.

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.

Angell, H., and Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 261–267.

Asada, H., Kishida, T., Hirai, H., Satoh, E., Ohashi, S., Takeuchi, M., Kubo, T., Kita, M., Iwakura, Y., Imanishi, J., et al. (2002). Significant antitumor effects obtained by autologous tumor cell vaccine engineered to secrete interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *5*, 609–616.

Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S., and Ganne, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev. Vaccines* *1*, 111–118.

Aucouturier, J., Ascarateil, S., and Dupuis, L. (2006). The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine* *24*, S44–S45.

Auricchio, L., Pallocca, M., Ciliberto, G., and Palombo, F. (2018). The perfect personalized cancer therapy: cancer vaccines against neoantigens. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *37*, 86.

B

Bachmann, M.F., and Jennings, G.T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 787–796.

Banday, A.H., Jeelani, S., and Hruby, V.J. (2015). Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* *37*, 1–11.

Barker, A.B.H., Schreurs, M.W.J., Tafazzul, G., Boer, A.J.D., Kawakami, Y., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (1995). Identification of a novel peptide derived from the melanocyte-specific gp100 antigen as the dominant epitope recognized by an HLA-A2.1-restricted anti-melanoma CTL line. *Int. J. Cancer* *62*, 97–102.

Barnd, D.L., Lan, M.S., Metzgar, R.S., and Finn, O.J. (1989). Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 7159–7163.

Barr, I.G., Sjölander, A., and Cox, J.C. (1998). ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *32*, 247–271.

Bartkowiak, T., Singh, S., Yang, G., Galvan, G., Haria, D., Ai, M., Allison, J.P., Sastry, K.J., and Curran, M.A. (2015). Unique potential of 4-1BB agonist antibody to promote durable regression of HPV+ tumors when combined with an E6/E7 peptide vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E5290-5299.

Barve, M., Bender, J., Senzer, N., Cunningham, C., Greco, F.A., McCune, D., Steis, R., Khong, H., Richards, D., Stephenson, J., et al. (2008). Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte

vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 4418–4425.

Bayyurt, B., Tincer, G., Almacioglu, K., Alpdundar, E., Gursel, M., and Gursel, I. (2017). Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *247*, 134–144.

Beck, C., Schreiber, H., and Rowley, D. (2001). Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc. Res. Tech.* *52*, 387–395.

Belizaire, R., and Unanue, E.R. (2009). Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17463–17468.

Bellamy, W.T., Richter, L., Sirjani, D., Roxas, C., Glinsmann-Gibson, B., Frutiger, Y., Grogan, T.M., and List, A.F. (2001). Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* *97*, 1427–1434.

Berinstein, N.L., Karkada, M., Morse, M.A., Nemunaitis, J.J., Chatta, G., Kaufman, H., Odunsi, K., Nigam, R., Sammaturo, L., MacDonald, L.D., et al. (2012). First-in-man application of a novel therapeutic cancer vaccine formulation with the capacity to induce multi-functional T cell responses in ovarian, breast and prostate cancer patients. *J. Transl. Med.* *10*, 156.

Berinstein, N.L., Karkada, M., Oza, A.M., Odunsi, K., Vilella, J.A., Nemunaitis, J.J., Morse, M.A., Pejovic, T., Bentley, J., Buysse, M., et al. (2015). Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients. *Oncoimmunology* *4*.

Berzofsky, J.A., and Terabe, M. (2008). NKT Cells in Tumor Immunity: Opposing Subsets Define a New Immunoregulatory Axis. *J. Immunol.* *180*, 3627–3635.

Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E., and Morris, J.C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* *113*, 1515–1525.

Beutler, E., Gelbart, T., and West, C. (2001). Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells. Mol. Dis.* *27*, 728–730.

Bhardwaj, N., Gnjatic, S., and Sawhney, N.B. (2010). TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants? *Cancer J. Sudbury Mass* *16*, 382–391.

Bhatia, A., and Kumar, Y. (2011). Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* *4*, 209–217.

Black, S., and Rappuoli, R. (2010). A Crisis of Public Confidence in Vaccines. *Sci. Transl. Med.* *2*, 61mr1-61mr1.

Boks, M.A., Bruijns, S.C.M., Ambrosini, M., Kalay, H., van Bloois, L., Storm, G., Gruijl, T. de, and van Kooyk, Y. (2015). In situ Delivery of Tumor Antigen- and Adjuvant-Loaded Liposomes Boosts Antigen-Specific T-Cell Responses by Human Dermal Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 2697–2704.

- Bonifant, C.L., Jackson, H.J., Brentjens, R.J., and Curran, K.J. (2016). Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, 16011.
- Bonini, C., and Mondino, A. (2015). Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells. *Eur. J. Immunol.* 45, 2457–2469.
- Bozzuto, G., and Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* 10, 975–999.
- Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol. Annu. Rev.* 7, 59–85.
- Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F., and Alexander, J. (1999). Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 6448–6454.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489–495.
- van Broekhoven, C.L., Parish, C.R., Demangel, C., Britton, W.J., and Altin, J.G. (2004). Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 64, 4357–4365.
- Brown, S.D., Warren, R.L., Gibb, E.A., Martin, S.D., Spinelli, J.J., Nelson, B.H., and Holt, R.A. (2014). Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* 24, 743–750.
- 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.
- Buffa, V., Klein, K., Fischetti, L., and Shattock, R.J. (2012). Evaluation of TLR Agonists as Potential Mucosal Adjuvants for HIV gp140 and Tetanus Toxoid in Mice. *PLoS ONE* 7.
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., and Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 9.
- Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2011). Translating Tumor Antigens into Cancer Vaccines. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 18, 23–34.
- Burg, S.H. van der, Arens, R., Ossendorp, F., Hall, T. van, and Melief, C.J.M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* 16, 219–233.
- van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2011). Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 252–257.
- Burnet, M. (1954). The Newer Approach to Immunity in Its Bearing on Medicine and Biology. *Br. Med. J.* 2, 189–193.
- Butterfield, L.H. (2015). Cancer vaccines. *The BMJ* 350.

Butts, C., Maksymiuk, A., Goss, G., Soulières, D., Marshall, E., Cormier, Y., Ellis, P.M., Price, A., Sawhney, R., Beier, F., et al. (2011). Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *137*, 1337–1342.

Butts, C., Socinski, M.A., Mitchell, P.L., Thatcher, N., Havel, L., Krzakowski, M., Nawrocki, S., Ciuleanu, T.-E., Bosquée, L., Trigo, J.M., et al. (2014). Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 59–68.

C

Campana, S., De Pasquale, C., Carrega, P., Ferlazzo, G., and Bonaccorsi, I. (2015). Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol. Lett.* *168*, 349–354.

Campbell, P.I. (1983). Toxicity of some charged lipids used in liposome preparations. *Cytobios* *37*, 21–26.

Carralot, J.-P., Weide, B., Schoor, O., Probst, J., Scheel, B., Teufel, R., Hoerr, I., Garbe, C., Rammensee, H.-G., and Pascolo, S. (2005). Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas. *Genet. Vaccines Ther.* *3*, 6.

Castro, F., Cardoso, A.P., Gonçalves, R.M., Serre, K., and Oliveira, M.J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* *9*, 847.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* *4*, 702–707.

Chang, C.-L., Tsai, Y.-C., He, L., Wu, T.-C., and Hung, C.-F. (2007). Cancer Immunotherapy Using Irradiated Tumor Cells Secreting Heat Shock Protein 70. *Cancer Res.* *67*, 10047–10057.

Chang, D.H., Osman, K., Connolly, J., Kukreja, A., Krasovsky, J., Pack, M., Hutchinson, A., Geller, M., Liu, N., Annable, R., et al. (2005). Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of α -galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J. Exp. Med.* *201*, 1503–1517.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). The production of armed effector T cells. *Immunobiol. Immune Syst. Health Dis.* 5th Ed.

Chaturvedi, A., and Pierce, S.K. (2009). How location governs Toll like receptor signaling. *Traffic Cph. Den.* *10*, 621–628.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1–10.

- Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321–330.
- Chen, W., and Huang, L. (2008). Induction of Cytotoxic T-Lymphocytes and Antitumor Activity by a Liposomal Lipopeptide Vaccine. *Mol. Pharm.* 5, 464–471.
- Chen, W., Yewdell, J.W., Levine, R.L., and Bennink, J.R. (1999). Modification of Cysteine Residues In Vitro and In Vivo Affects the Immunogenicity and Antigenicity of Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Viral Determinants. *J. Exp. Med.* 189, 1757–1764.
- Chen, W.C., Kawasaki, N., Nycholat, C.M., Han, S., Pilotte, J., Crocker, P.R., and Paulson, J.C. (2012). Antigen Delivery to Macrophages Using Liposomal Nanoparticles Targeting Sialoadhesin/CD169. *PLoS ONE* 7.
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1914–1918.
- Cherryholmes, G.A., Stanton, S.E., and Disis, M.L. (2015). Current methods of epitope identification for cancer vaccine design. *Vaccine* 33, 7408–7414.
- Church, S.E., Jensen, S.M., Twitty, C., Bahjat, K., Hu, H.-M., Urba, W.J., and Fox, B.A. (2011). Multiple Vaccinations: Friend or Foe. *Cancer J. Sudbury Mass* 17, 379–396.
- Claassen, I., and Osterhaus, A. (1992). The iscom structure as an immune-enhancing moiety: experience with viral systems. *Res. Immunol.* 143, 531–541.
- Clements, C.J., and Griffiths, E. (2002). The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine* 20 Suppl 3, S24-33.
- Coccia, M., Collignon, C., Hervé, C., Chalon, A., Welsby, I., Detienne, S., Helden, M.J. van, Dutta, S., Genito, C.J., Waters, N.C., et al. (2017). Cellular and molecular synergy in AS01-adjuvanted vaccines results in an early IFN γ response promoting vaccine immunogenicity. *Npj Vaccines* 2, 25.
- Colditz, G.A., and Wei, E.K. (2012). Preventability of cancer: the relative contributions of biologic and social and physical environmental determinants of cancer mortality. *Annu. Rev. Public Health* 33, 137–156.
- Colditz, G.A., Sellers, T.A., and Trapido, E. (2006). Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer* 6, 75–83.
- Connor, D.M., and Broome, A.-M. (2018). Gold Nanoparticles for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Adv. Cancer Res.* 139, 163–184.
- Cooper, G.M. (2000). *The Development and Causes of Cancer. Cell Mol. Approach* 2nd Ed.
- Copier, J., and Dalgleish, A. (2006). Overview of tumor cell-based vaccines. *Int. Rev. Immunol.* 25, 297–319.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 135–146.

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

Crowe, S.R., Miller, S.C., Brown, D.M., Adams, P.S., Dutton, R.W., Harmsen, A.G., Lund, F.E., Randall, T.D., Swain, S.L., and Woodland, D.L. (2006). Uneven distribution of MHC class II epitopes within the influenza virus. *Vaccine* *24*, 457–467.

Cruz, L.J., Rueda, F., Simón, L., Cordobilla, B., Albericio, F., and Domingo, J.C. (2014). Liposomes containing NY-ESO-1/tetanus toxoid and adjuvant peptides targeted to human dendritic cells via the Fc receptor for cancer vaccines. *Nanomed.* *9*, 435–449.

Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4275–4280.

Cusi, M.G. (2006). Applications of influenza virosomes as a delivery system. *Hum. Vaccin.* *2*, 1–7.

D

Dalgleish, A.G. (2015). Vaccines versus immunotherapy: Overview of approaches in deciding between options. *Hum. Vaccines Immunother.* *10*, 3369–3374.

Dammeijer, F., Lievense, L.A., Kaijen-Lambers, M.E., van Nimwegen, M., Bezemer, K., Hegmans, J.P., van Hall, T., Hendriks, R.W., and Aerts, J.G. (2017). Depletion of Tumor-Associated Macrophages with a CSF-1R Kinase Inhibitor Enhances Antitumor Immunity and Survival Induced by DC Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 535–546.

De Backer, O., Arden, K.C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C.S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., et al. (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* *59*, 3157–3165.

De Gregorio, E., and Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 505–514.

Decoster, L., Wauters, I., and Vansteenkiste, J.F. (2012). Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer: review of agents in phase III development. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 1387–1393.

DeGregorio, M., Soe, L., and Wolf, M. (2014). Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small cell lung cancer (START): a randomized, double-blind, phase III trial. *J. Thorac. Dis.* *6*, 571–573.

DeLeo, A.B. (1998). p53-based immunotherapy of cancer. *Crit. Rev. Immunol.* *18*, 29–35.

Demotz, S., Lanzavecchia, A., Eisel, U., Niemann, H., Widmann, C., and Corradin, G. (1989). Delineation of several DR-restricted tetanus toxin T cell epitopes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *142*, 394–402.

Demoulin, S., Herfs, M., Delvenne, P., and Hubert, P. (2013). Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 343–352.

Dhiman, N., Ovsyannikova, I.G., Vierkant, R.A., Ryan, J.E., Pankratz, V.S., Jacobson, R.M., and Poland, G.A. (2008). Associations between SNPs in toll-like receptors and related intracellular signaling molecules and immune responses to measles vaccine: preliminary results. *Vaccine* *26*, 1731–1736.

Diehl, L., den Boer, A.T., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Schumacher, T.N., Melief, C.J., Offringa, R., and Toes, R.E. (1999). CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.* *5*, 774–779.

Dijkstra, J., Ryan, J.L., and Szoka, F.C. (1988). A procedure for the efficient incorporation of wild-type lipopolysaccharide into liposomes for use in immunological studies. *J. Immunol. Methods* *114*, 197–205.

Dillman, R.O. (2016). Is there a role for therapeutic cancer vaccines in the age of checkpoint inhibitors? *Hum. Vaccines Immunother.* *13*, 528–532.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* *8*, 793–800.

Dowling, J.K., and Mansell, A. (2016). Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunol.* *5*, e85.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R.C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3539–3543.

Dreno, B., Thompson, J.F., Smithers, B.M., Santinami, M., Jouary, T., Gutzmer, R., Levchenko, E., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Korovin, S., et al. (2018). MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy for patients with resected, MAGE-A3-positive, stage III melanoma (DERMA): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.*

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., et al. (2002). Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* *298*, 850–854.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 329–360.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.

Duraiswamy, J., Kaluza, K.M., Freeman, G.J., and Coukos, G. (2013). Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T-Cell Rejection Function in Tumors. *Cancer Res.* 73, 3591–3603.

Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., and Mami-Chouaib, F. (2018). Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 14.

E

Ebrahimian, M., Hashemi, M., Maleki, M., Hashemitabar, G., Abnous, K., Ramezani, M., and Haghparast, A. (2017). Co-delivery of Dual Toll-Like Receptor Agonists and Antigen in Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid/Polyethylenimine Cationic Hybrid Nanoparticles Promote Efficient In Vivo Immune Responses. *Front. Immunol.* 8, 1077.

Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823–836.

Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122–1126.

Emens, L.A., and Middleton, G. (2015). The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunol. Res.* 3, 436–443.

Engel, A.L., Holt, G.E., and Lu, H. (2011). The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 4, 275–289.

Epstein, N.A., and Fatti, L.P. (1976). Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis. *Cancer* 37, 2455–2465.

Espuelas, S., Roth, A., Thumann, C., Frisch, B., and Schuber, F. (2005). Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells. *Mol. Immunol.* 42, 721–729.

Espuelas, S., Thumann, C., Heurtault, B., Schuber, F., and Frisch, B. (2008). Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannoseylated liposomes. *Bioconjug. Chem.* 19, 2385–2393.

F

Fan, Y., and Zhang, Q. (2013). Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 81–87.

- Fan, X., Yu, K., Wu, J., Shao, J., Zhu, L., and Zhang, J. (2015). Correlation between squamous cell carcinoma of the lung and human papillomavirus infection and the relationship to expression of p53 and p16. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 3043–3049.
- Farkona, S., Diamandis, E.P., and Blasutig, I.M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med.* *14*, 73.
- Farsaci, B., Donahue, R.N., Grenga, I., Lepone, L.M., Kim, P.S., Dempsey, B., Siebert, J.C., Ibrahim, N.K., Madan, R.A., Heery, C.R., et al. (2016). Analyses of Pre-therapy Peripheral Immunoscore and Response to Vaccine Therapy. *Cancer Immunol. Res.* *4*, 755–765.
- Fayolle, C., Deriaud, E., and Leclerc, C. (1991). In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *J. Immunol.* *147*, 4069–4073.
- FDA-approval (2018). Resources for Information on Approved Drugs (FDA-approval).
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F.C., and Plebanski, M. (2004). Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 3148–3154.
- Finn, O.J. (2017). Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 347–354.
- Finn, O.J. (2018). The dawn of vaccines for cancer prevention. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 183–194.
- Fischetti, L., Zhong, Z., Pinder, C.L., Tregoning, J.S., and Shattock, R.J. (2017). The synergistic effects of combining TLR ligand based adjuvants on the cytokine response are dependent upon p38/JNK signalling. *Cytokine* *99*, 287–296.
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* *181*, 2109–2117.
- Fleming, C., Morrissey, S., Cai, Y., and Yan, J. (2017). $\gamma\delta$ T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression. *Trends Cancer* *3*, 561–570.
- Foged, C., Rades, T., Perrie, Y., and Hook, S. (2015). Chapter 4. Emulsions as Vaccine Adjuvants - Subunit Vaccine Delivery (New York: Springer-Verlag).
- Frederick, D.T., Piris, A., Cogdill, A.P., Cooper, Z.A., Lezcano, C., Ferrone, C.R., Mitra, D., Boni, A., Newton, L.P., Liu, C., et al. (2013). BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1225–1231.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298–306.

Frisch, B., Muller, S., Briand, J.P., Van Regenmortel, M.H., and Schuber, F. (1991). Parameters affecting the immunogenicity of a liposome-associated synthetic hexapeptide antigen. *Eur. J. Immunol.* *21*, 185–193.

Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J.G., Fsihi, H., Kufer, T.A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R.L., Girardin, S.E., et al. (2007). Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* *26*, 445–459.

Fromen, C.A., Rahhal, T.B., Robbins, G.R., Kai, M.P., Shen, T.W., Luft, J.C., and DeSimone, J.M. (2016). Nanoparticle surface charge impacts distribution, uptake and lymph node trafficking by pulmonary antigen-presenting cells. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *12*, 677–687.

G

Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity* *39*, 11–26.

Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* *37*, 855–865.

Garg, A.D., More, S., Rufo, N., Mece, O., Sassano, M.L., Agostinis, P., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017). Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics. *Oncoimmunology* *6*, e1386829.

Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E.M., Garcia Lora, A.M., and van Hall, T. (2016). The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* *39*, 44–51.

Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 465–479.

Gérard, C., Baudson, N., Ory, T., and Louahed, J. (2014). Tumor Mouse Model Confirms MAGE-A3 Cancer Immunotherapeutic As an Efficient Inducer of Long-Lasting Anti-Tumoral Responses. *PLoS ONE* *9*.

Ghinnagow, R., Cruz, L.J., Macho-Fernandez, E., Faveeuw, C., and Trottein, F. (2017). Enhancement of Adjuvant Functions of Natural Killer T Cells Using Nanovector Delivery Systems: Application in Anticancer Immune Therapy. *Front. Immunol.* *8*.

Giannakis, M., Mu, X.J., Shukla, S.A., Qian, Z.R., Cohen, O., Nishihara, R., Bahl, S., Cao, Y., Amin-Mansour, A., Yamauchi, M., et al. (2016). Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* *15*, 857–865.

Gibney, G.T., Kudchadkar, R.R., DeConti, R.C., Thebeau, M.S., Czupryn, M.P., Tetteh, L., Eysmans, C., Richards, A., Schell, M.J., Fisher, K.J., et al. (2015). Safety, correlative markers, and clinical results of adjuvant nivolumab in combination with vaccine in resected high-risk metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *21*, 712–720.

- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* *11*, 263–270.
- Godfrey, D.I., and Kronenberg, M. (2004). Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* *114*, 1379–1388.
- Gregory, A.E., Titball, R., and Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *3*.
- Grenier, J.M., Yeung, S.T., and Khanna, K.M. (2018). Combination Immunotherapy: Taking Cancer Vaccines to the Next Level. *Front. Immunol.* *9*.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734–738.
- Gross, L. (2009). A Broken Trust: Lessons from the Vaccine–Autism Wars. *PLoS Biol.* *7*.
- del Guercio, M.F., Alexander, J., Kubo, R.T., Arrhenius, T., Maewal, A., Appella, E., Hoffman, S.L., Jones, T., Valmori, D., Sakaguchi, K., et al. (1997). Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. *Vaccine* *15*, 441–448.
- Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., and Wang, X.-Y. (2013). Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. *Adv. Cancer Res.* *119*, 421–475.
- Gupta, S., Termini, J.M., Rivas, Y., Otero, M., Raffa, F.N., Bhat, V., Farooq, A., and Stone, G.W. (2015). A multi-trimeric fusion of CD40L and gp100 tumor antigen activates dendritic cells and enhances survival in a B16-F10 melanoma DNA vaccine model. *Vaccine* *33*, 4798–4806.

H

- Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8⁺ but Not Cd8[–] Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685–1696.
- Hamborg, M., Jorgensen, L., Bojsen, A.R., Christensen, D., and Foged, C. (2013). Protein antigen adsorption to the DDA/TDB liposomal adjuvant: effect on protein structure, stability, and liposome physicochemical characteristics. *Pharm. Res.* *30*, 140–155.
- Hamilton, E., Blackwell, K., Hobeika, A.C., Clay, T.M., Broadwater, G., Ren, X.-R., Chen, W., Castro, H., Lehmann, F., Spector, N., et al. (2012). Phase 1 clinical trial of HER2-specific immunotherapy with concomitant HER2 kinase inhibition [corrected]. *J. Transl. Med.* *10*, 28.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanna, M.G., and Peters, L.C. (1978). Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery. *Cancer* *42*, 2613–2625.
- Harashima, H., Hirai, N., and Kiwada, H. (1995). Kinetic modelling of liposome degradation in peritoneal macrophages. *Biopharm. Drug Dispos.* *16*, 113–123.

Harper, D.M., and DeMars, L.R. (2017). HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecol. Oncol.* *146*, 196–204.

Harris, J.R., and Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* *30*, 597–623.

Hartmann, J., Schübler-Lenz, M., Bondanza, A., and Buchholz, C.J. (2017). Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1183–1197.

Henriksen-Lacey, M., Christensen, D., Bramwell, V.W., Lindenstrøm, T., Agger, E.M., Andersen, P., and Perrie, Y. (2010). Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *145*, 102–108.

Heurtault, B., Gentine, P., Thomann, J.-S., Baehr, C., Frisch, B., and Pons, F. (2009). Design of a liposomal candidate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. *Pharm. Res.* *26*, 276–285.

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.

Hu, Y., Petroni, G.R., Olson, W.C., Czarkowski, A., Smolkin, M.E., Grosh, W.W., Chianese-Bullock, K.A., and Slingluff, C.L. (2014). Immunologic hierarchy, class II MHC promiscuity, and epitope spreading of a melanoma helper peptide vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *63*, 779–786.

Hu, Z., Ott, P.A., and Wu, C.J. (2018). Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 168–182.

Huang, H.-I., Wu, P.-Y., Teo, C.-Y., Chen, M.-N., Chen, Y.-C., Silin, D., and Tao, M.-H. (2004). Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand. *Int. J. Cancer* *108*, 696–703.



Ibrahim, N.K., Murray, J.L., Zhou, D., Mittendorf, E.A., Sample, D., Tautchin, M., and Miles, D. (2013). Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *J. Cancer* *4*, 577–584.

Ignatius, R., Mahnke, K., Rivera, M., Hong, K., Isdell, F., Steinman, R.M., Pope, M., and Stamatatos, L. (2000). Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood* *96*, 3505–3513.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 277–288.

Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., et al. (1997). Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89, 1405–1412.

Ishida, T., Harashima, H., and Kiwada, H. (2001). Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. *Curr. Drug Metab.* 2, 397–409.

Itakura, S., Hama, S., Ohgita, T., and Kogure, K. (2014). Development of Nanoparticles Incorporating a Novel Liposomal Membrane Destabilization Peptide for Efficient Release of Cargos into Cancer Cells. *PLOS ONE* 9, e111181.

J

Jackson, H.J., Rafiq, S., and Brentjens, R.J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 370–383.

Janssen, A., and Medema, R.H. (2013). Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene* 32, 4459–4470.

Jardim, D.L., Gagliato, D. de M., Giles, F.J., and Kurzrock, R. (2017). Analysis of Drug Development Paradigms for Immune Checkpoint inhibitors. *Clin. Cancer Res. clincanres.1970.2017.*

Jass, J.R. (1986). Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 39, 585–589.

Jessy, T. (2011). Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2, 43–49.

Jia, Q., Yang, Y., and Wan, Y. (2015). Tumor-infiltrating memory T-lymphocytes for prognostic prediction in cancer patients: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 1803–1813.

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

Johansen, P., Martínez Gómez, J.M., and Gander, B. (2007). Development of synthetic biodegradable microparticulate vaccines: a roller coaster story. *Expert Rev. Vaccines* 6, 471–474.

Johansen, P., Storni, T., Rettig, L., Qiu, Z., Der-Sarkissian, A., Smith, K.A., Manolova, V., Lang, K.S., Senti, G., Müllhaupt, B., et al. (2008). Antigen kinetics determines immune reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5189–5194.

Jolley, D., and Douglas, K.M. (2014). The Effects of Anti-Vaccine Conspiracy Theories on Vaccination Intentions. *PLoS ONE* 9.

Joshi, M.D., Unger, W.J., Storm, G., van Kooyk, Y., and Mastrobattista, E. (2012). Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *J. Controlled Release* 161, 25–37.

Juliano, R.L., Alam, R., Dixit, V., and Kang, H.M. (2009). Cell-targeting and cell-penetrating peptides for delivery of therapeutic and imaging agents. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* *1*, 324–335.

K

Kakhi, Z., Frisch, B., Bourel-Bonnet, L., Hemmerlé, J., Pons, F., and Heurtault, B. (2015). Airway administration of a highly versatile peptide-based liposomal construct for local and distant antitumoral vaccination. *Int. J. Pharm.* *496*, 1047–1056.

Kakhi, Z., Frisch, B., Heurtault, B., and Pons, F. (2016). Liposomal constructs for antitumoral vaccination by the nasal route. *Biochimie* *130*, 14–22.

Kamdar, K., Nguyen, V., and DePaolo, R.W. (2013). Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence* *4*, 207–212.

Karathanasis, E., Geigerman, C.M., Parkos, C.A., Chan, L., Bellamkonda, R.V., and Jaye, D.L. (2009). Selective targeting of nanocarriers to neutrophils and monocytes. *Ann. Biomed. Eng.* *37*, 1984–1992.

Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., et al. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* *470*, 543–547.

Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* *21*, 317–337.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* *34*, 637–650.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Yannelli, J.R., Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *180*, 347–352.

Keilholz, U., Martus, P., and Scheibenbogen, C. (2006). Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 2346s–2352s.

Kelly, C., Jefferies, C., and Cryan, S.-A. (2011). Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. *J. Drug Deliv.* *2011*, 727241.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* *222*, 129–144.

Kenneth Murphy (2011). *Immunobiology* (Garland Science).

Kenter, G.G., Welters, M.J.P., Valentijn, A.R.P.M., Lowik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Vloon, A.P.G., Essahsah, F., Fathors, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., et al. (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1838–1847.

- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562–575.
- Khong, H., and Overwijk, W.W. (2016a). Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J. Immunother. Cancer* 4.
- Khong, H., and Overwijk, W.W. (2016b). Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J. Immunother. Cancer* 4.
- Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.
- Khong, H.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Mavroukakis, S.A., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2004). Immunization of HLA-A*0201 and/or HLA-DPbeta1*04 patients with metastatic melanoma using epitopes from the NY-ESO-1 antigen. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 27, 472–477.
- Kim, H.-J., and Cantor, H. (2014). CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol. Res.* 2, 91–98.
- 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.
- Knudsen, M.L., Ljungberg, K., Kakoulidou, M., Kostic, L., Hallengård, D., García-Arriaza, J., Merits, A., Esteban, M., and Liljeström, P. (2014). Kinetic and Phenotypic Analysis of CD8+ T Cell Responses after Priming with Alphavirus Replicons and Homologous or Heterologous Booster Immunizations. *J. Virol.* 88, 12438–12451.
- Knudsen, N.P.H., Olsen, A., Buonsanti, C., Follmann, F., Zhang, Y., Coler, R.N., Fox, C.B., Meinke, A., D’Oro, U., Casini, D., et al. (2016). Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci. Rep.* 6, 19570.
- Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 54, 721–728.
- Knutson, K.L., Schiffman, K., and Disis, M.L. (2001). Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J. Clin. Invest.* 107, 477–484.
- Koenig, S., Woods, R.M., Brewah, Y.A., Newell, A.J., Jones, G.M., Boone, E., Adelsberger, J.W., Baseler, M.W., Robinson, S.M., and Jacobson, S. (1993). Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. *J. Immunol.* 151, 3874–3883.
- Korman, A.J., Peggs, K.S., and Allison, J.P. (2006). Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy. *Adv. Immunol.* 90, 297–339.

* Toutes les citations au verso des pages colorées sont liées par leur premier et dernier mot en gras. Un petit clin d’œil que je souhaitais ajouter à ma thèse pour illustrer que "la boucle est bouclée".

Kraaijeveld, C.A., Schilham, M., Jansen, J., Benaissa-Trouw, B., Harmsen, M., van Houte, A.J., and Snippe, H. (1984). The effect of liposomal charge on the neutralizing antibody response against inactivated encephalomyocarditis and Semliki Forest viruses. *Clin. Exp. Immunol.* *56*, 509–514.

Krijgsman, D., Hokland, M., and Kuppen, P.J.K. (2018). The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. *Front. Immunol.* *9*, 367.

Krishnamachari, Y., Geary, S.M., Lemke, C.D., and Salem, A.K. (2011). Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharm. Res.* *28*, 215–236.

Krishnaswamy, J.K., Chu, T., and Eisenbarth, S.C. (2013). Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol.* *34*, 224–233.

Kroemer, G., Zitvogel, L., and Galluzzi, L. (2013). Victories and deceptions in tumor immunology. *Oncol Immunology* *2*, e23687.

Kruit, W.H.J., Suci, S., Dreno, B., Mortier, L., Robert, C., Chiarion-Sileni, V., Maio, M., Testori, A., Dorval, T., Grob, J.-J., et al. (2013). Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 2413–2420.

Kuball, J., de Boer, K., Wagner, E., Wattad, M., Antunes, E., Weeratna, R.D., Vicari, A.P., Lotz, C., van Dorp, S., Hol, S., et al. (2011). Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *60*, 161–171.

L

Lambricht, L., Lopes, A., Kos, S., Sersa, G., Pr at, V., and Vandermeulen, G. (2016). Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* *13*, 295–310.

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., and Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* *1*, 147–168.

Larocca, C., and Schlom, J. (2011). Viral Vector –based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer J. Sudbury Mass* *17*, 359–371.

Larson, H.J., de Figueiredo, A., Xiaohong, Z., Schulz, W.S., Verger, P., Johnston, I.G., Cook, A.R., and Jones, N.S. (2016). The State of Vaccine Confidence 2016: Global Insights Through a 67-Country Survey. *EBioMedicine* *12*, 295–301.

Laubret, D., Bay, S., Sedlik, C., Artaud, C., Ganneau, C., D eriaud, E., Viel, S., Puaux, A.-L., Amigorena, S., G erard, C., et al. (2016). The fully synthetic MAG-Tn3 therapeutic vaccine containing the tetanus toxoid-derived TT830-844 universal epitope provides anti-tumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *65*, 315–325.

Lawson, D.H., Lee, S., Zhao, F., Tarhini, A.A., Margolin, K.A., Ernstoff, M.S., Atkins, M.B., Cohen, G.I., Whiteside, T.L., Butterfield, L.H., et al. (2015). Randomized, Placebo-

Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 4066–4076.

Le Marchand, L. (2005). The predominance of the environment over genes in cancer causation: implications for genetic epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *14*, 1037–1039.

Lee, S., and Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* *3*, 3856–3893.

Lesterhuis, W.J., Haanen, J.B.A.G., and Punt, C.J.A. (2011). Cancer immunotherapy – revisited. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 591–600.

Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* *139*, 891–906.

Li, B., VanRoey, M., Wang, C., Chen, T.T., Korman, A., and Jooss, K. (2009). Anti-Programmed Death-1 Synergizes with Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor–Secreting Tumor Cell Immunotherapy Providing Therapeutic Benefit to Mice with Established Tumors. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1623–1634.

Lim, S.H., Wang, Z., Chiriva-Internati, M., and Xue, Y. (2001). Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Blood* *97*, 1508–1510.

Limentani, S.A., Campone, M., Dorval, T., Curigliano, G., de Boer, R., Vogel, C., White, S., Bachelot, T., Canon, J.-L., Disis, M., et al. (2016). A non-randomized dose-escalation Phase I trial of a protein-based immunotherapeutic for the treatment of breast cancer patients with HER2-overexpressing tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* *156*, 319–330.

Lin, G., Chen, S., and Mi, P. (2018). Nanoparticles Targeting and Remodeling Tumor Microenvironment for Cancer Theranostics. *J. Biomed. Nanotechnol.* *14*, 1189–1207.

Lin, K.Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O’Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M., and Wu, T.C. (1996). Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* *56*, 21–26.

Lipponen, P.K., Eskelinen, M.J., Jauhiainen, K., Harju, E., and Terho, R. (1992). Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *29A*, 69–75.

Liu, M.A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* *239*, 62–84.

Liu, M.A., and Ulmer, J.B. (2005). Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv. Genet.* *55*, 25–40.

Liu, Y., and Cao, X. (2016). Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J. Mol. Med.* *94*, 509–522.

Liu, J., Blake, S.J., Yong, M.C.R., Harjunpää, H., Ngiow, S.F., Takeda, K., Young, A., O'Donnell, J.S., Allen, S., Smyth, M.J., et al. (2016). Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer Discov.* *6*, 1382–1399.

Lonez, C., Vandenbranden, M., and Ruyschaert, J.-M. (2012). Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *64*, 1749–1758.

Löwenadler, B., Svennerholm, A.M., Gidlund, M., Holmgren, E., Krook, K., Svanholm, C., Ulf, S., and Josephson, S. (1990). Enhanced immunogenicity of recombinant peptide fusions containing multiple copies of a heterologous T helper epitope. *Eur. J. Immunol.* *20*, 1541–1545.

Lu, C., Wang, A., Dorsch, M., Tian, J., Nagashima, K., Coyle, A.J., Jaffee, B., Ocain, T.D., and Xu, Y. (2005). Participation of Rip2 in Lipopolysaccharide Signaling Is Independent of Its Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 16278–16283.

Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* *196*, 395–406.

Ludwig, C., and Wagner, R. (2007). Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotechnol.* *18*, 537–545.

Lundstrom, K. (2018). Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci. OA* *4*.

Luo, Y.-H., Chang, L.W., and Lin, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Res. Int.* *2015*.

M

Ma, W., Smith, T., Bogin, V., Zhang, Y., Ozkan, C., Ozkan, M., Hayden, M., Schroter, S., Carrier, E., Messmer, D., et al. (2011). Enhanced presentation of MHC class Ia, Ib and class II-restricted peptides encapsulated in biodegradable nanoparticles: a promising strategy for tumor immunotherapy. *J. Transl. Med.* *9*, 34.

Madan-Lala, R., Pradhan, P., and Roy, K. (2017). Combinatorial Delivery of Dual and Triple TLR Agonists via Polymeric Pathogen-like Particles Synergistically Enhances Innate and Adaptive Immune Responses. *Sci. Rep.* *7*, 2530.

Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R. Mozafari, M., Gaiani, C., and Linder, M. (2011). Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies.

Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D.J., and De Gregorio, E. (2014). Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 12294–12299.

Maji, M., Mazumder, S., Bhattacharya, S., Choudhury, S.T., Sabur, A., Shadab, M., Bhattacharya, P., and Ali, N. (2016). A Lipid Based Antigen Delivery System Efficiently Facilitates MHC Class-I Antigen Presentation in Dendritic Cells to Stimulate CD8⁺ T Cells. *Sci. Rep.* *6*, 27206.

- Mallick, S., and Choi, J.S. (2014). Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *14*, 755–765.
- Mandrizzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and Bruggen, P. van der (1997). A CASP-8 Mutation Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Head and Neck Carcinoma. *J. Exp. Med.* *186*, 785–793.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* *13*, 607–615.
- Massilamany, C., Krishnan, B., and Reddy, J. (2015). Major Histocompatibility Complex Class II Dextramers: New Tools for the Detection of antigen-Specific, CD4 T Cells in Basic and Clinical Research. *Scand. J. Immunol.* *82*, 399–408.
- McCarthy, E.F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop. J.* *26*, 154–158.
- McDermott, D., Haanen, J., Chen, T.-T., Lorigan, P., O'Day, S., and MDX010-20 Investigators (2013). Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *24*, 2694–2698.
- McEntee, C., Lavelle, E.C., and O'Hagan, D.T. (2015). Chapter 63 - Antigen Delivery Systems I: Nonliving Microparticles, Liposomes, and Immune-Stimulating Complexes (ISCOMs). In *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*, J. Mestecky, W. Strober, M.W. Russell, B.L. Kelsall, H. Cheroutre, and B.N. Lambrecht, eds. (Boston: Academic Press), pp. 1211–1231.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., et al. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 509–524.
- Melief, C.J.M., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., and van der Burg, S.H. (2015). Therapeutic cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* *125*, 3401–3412.
- Mellman, I. (2013). Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol. Res.* *1*, 145–149.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* *106*, 255–258.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* *480*, 480–489.
- Mercier, B.C., Ventre, E., Fogeron, M.-L., Debaud, A.-L., Tomkowiak, M., Marvel, J., and Bonnefoy, N. (2012). NOD1 Cooperates with TLR2 to Enhance T Cell Receptor-Mediated Activation in CD8 T Cells. *PLOS ONE* *7*, e42170.
- Middleton, G., Silcocks, P., Cox, T., Valle, J., Wadsley, J., Propper, D., Coxon, F., Ross, P., Madhusudan, S., Roques, T., et al. (2014). Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 829–840.

Minuk, G.Y., Bautista, W., and Klein, J. (2016). Evidence of Hepatitis B Virus Infection in Cancer and Noncancer Stem Cells Associated with Human Hepatocellular Carcinoma. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. J. Can. Mal. Infect. Microbiol. Médicale* 2016.

Mishra, G.A., Pimple, S.A., and Shastri, S.S. (2015). HPV vaccine: One, two, or three doses for cervical cancer prevention? *Indian J. Med. Paediatr. Oncol. Off. J. Indian Soc. Med. Paediatr. Oncol.* 36, 201–206.

Mitchell, D., Yong, M., Schroder, W., Black, M., Tirrell, M., and Olive, C. (2010). Dual Stimulation of MyD88-Dependent Toll-Like Receptors Induces Synergistically Enhanced Production of Inflammatory Cytokines in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *J. Infect. Dis.* 202, 318–329.

Mitchell, P., Thatcher, N., Socinski, M.A., Wasilewska-Tesluk, E., Horwood, K., Szczesna, A., Martín, C., Ragulin, Y., Zukin, M., Helwig, C., et al. (2015). Tecemotide in unresectable stage III non-small-cell lung cancer in the phase III START study: updated overall survival and biomarker analyses. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1134–1142.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.

Mittendorf, E.A., Clifton, G.T., Holmes, J.P., Clive, K.S., Patil, R., Benavides, L.C., Gates, J.D., Sears, A.K., Stojadinovic, A., Ponniah, S., et al. (2012). Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* 118, 2594–2602.

Mizukoshi, E., Yamashita, T., Arai, K., Sunagozaka, H., Ueda, T., Arihara, F., Kagaya, T., Yamashita, T., Fushimi, K., and Kaneko, S. (2013). Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* 57, 1448–1457.

Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., and Marincola, F.M. (2004). Correspondence 1: Cancer vaccines: pessimism in check. *Nat. Med.* 10, 1278–1279.

Mondini, M., Nizard, M., Tran, T., Mauge, L., Loi, M., Clémenson, C., Dugue, D., Maroun, P., Louvet, E., Adam, J., et al. (2015). Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1336–1345.

Morein, B., and Simons, K. (1985). Subunit vaccines against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes. *Vaccine* 3, 83–93.

Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, H.K., and Clay, T.M. (2008). Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 112, 610–618.

Moudgil, K.D., Sercarz, E.E., and Grewal, I.S. (1998). Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunol. Today* 19, 217–220.

Murphy, M.A., O’Leary, J.J., and Cahill, D.J. (2012). Assessment of the humoral immune response to cancer. *J. Proteomics* 75, 4573–4579.

Murray, R.J., Kurilla, M.G., Brooks, J.M., Thomas, W.A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A.B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.* *176*, 157–168.

Myers, K.A., Applegate, K.T., Danuser, G., Fischer, R.S., and Waterman, C.M. (2011). Distinct ECM mechanosensing pathways regulate microtubule dynamics to control endothelial cell branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* *192*, 321–334.

N

Nakanishi, T., Kunisawa, J., Hayashi, A., Tsutsumi, Y., Kubo, K., Nakagawa, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T., and Mayumi, T. (1997). Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *240*, 793–797.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* *6*, 769–776.

NCT00480025 Antigen-Specific Cancer Immunotherapeutic as Adjuvant Therapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer (GSK1572932A)- [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

NCT00796445 A Phase III Study to Test the Benefit of a New Kind of Anti-cancer Treatment in Patients With Melanoma, After Surgical Removal of Their Tumor - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Nemunaitis, J. (2005). Vaccines in cancer: GVAX, a GM-CSF gene vaccine. *Expert Rev. Vaccines* *4*, 259–274.

Ngwa, W., Irabor, O.C., Schoenfeld, J.D., Hesser, J., Demaria, S., and Formenti, S.C. (2018). Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 313–322.

Nicholson, S.E., Keating, N., and Belz, G.T. (2017). Natural killer cells and anti-tumor immunity. *Mol. Immunol.*

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* *27*, 1–7.

North, S., and Butts, C. (2005). Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers. *Expert Rev. Vaccines* *4*, 249–257.

Novellino, L., Castelli, C., and Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *54*, 187–207.

O

O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.

Opel, D.J., Diekema, D.S., and Marcuse, E.K. (2011). Assuring research integrity in the wake of Wakefield. *BMJ* 342, d2.

Orr, M.T., Beebe, E.A., Hudson, T.E., Moon, J.J., Fox, C.B., Reed, S.G., and Coler, R.N. (2014). A Dual TLR Agonist Adjuvant Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of the Tuberculosis Vaccine Antigen ID93. *PLOS ONE* 9, e83884.

Oscherwitz, J., Yu, F., and Cease, K.B. (2009). A heterologous helper T-cell epitope enhances the immunogenicity of a multiple-antigenic-peptide vaccine targeting the cryptic loop-neutralizing determinant of *Bacillus anthracis* protective antigen. *Infect. Immun.* 77, 5509–5518.

Ossendorp, F., Mengedé, E., Camps, M., Filius, R., and Melief, C.J.M. (1998). Specific T Helper Cell Requirement for Optimal Induction of Cytotoxic T Lymphocytes against Major Histocompatibility Complex Class II Negative Tumors. *J. Exp. Med.* 187, 693–702.

O’Sullivan, D., Arrhenius, T., Sidney, J., Del Guercio, M.F., Albertson, M., Wall, M., Oseroff, C., Southwood, S., Colón, S.M., and Gaeta, F.C. (1991). On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 147, 2663–2669.

Ouyang, X., Negishi, H., Takeda, R., Fujita, Y., Taniguchi, T., and Honda, K. (2007). Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 1045–1051.

Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 1224–1232.

P

Pace, L., Vitale, S., Dettori, B., Palombi, C., La Sorsa, V., Belardelli, F., Proietti, E., and Doria, G. (2010). APC activation by IFN-alpha decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 5969–5979.

Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., et al. (2006). Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 983–990.

Palucka, A.K., and Coussens, L.M. (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell* 164, 1233–1247.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* 12, 265–277.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.

Park, J.-E., Wu, D.Y., Prendes, M., Lu, S.X., Ragupathi, G., Schrantz, N., and Chapman, P.B. (2008). Fine specificity of natural killer T cells against GD3 ganglioside and

- identification of GM3 as an inhibitory natural killer T-cell ligand. *Immunology* 123, 145–155.
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254.
- Penn, I. (1981). Depressed immunity and the development of cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 46, 459–474.
- Peres, C., Matos, A.I., Conniot, J., Sainz, V., Zupančič, E., Silva, J.M., Graça, L., Sá Gaspar, R., Prêat, V., and Florindo, H.F. (2017). Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomater.* 48, 41–57.
- Phan, G.Q., Touloukian, C.E., Yang, J.C., Restifo, N.P., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Seipp, C.A., Freezer, L.J., et al. (2003). Immunization of Patients with Metastatic Melanoma Using Both Class I- and Class II-restricted Peptides from Melanoma-associated Antigens. *J. Immunother.* 26, 349–356.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 9–23.
- du Plessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., and Müller, D.G. (1996). The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *Int. J. Pharm.* 127, 273–278.
- Pluhar, G.E., Pennell, C.A., and Olin, M.R. (2015). CD8⁺ T Cell-Independent Immune-Mediated Mechanisms of Anti-Tumor Activity. *Crit. Rev. Immunol.* 35, 153–172.
- Poelgeest, M.I.E. van, Welters, M.J.P., Vermeij, R., Stynenbosch, L.F.M., Loof, N.M., Meer, D.M.A.B. der, Löwik, M.J.G., Hamming, I.L.E., Esch, E.M.G. van, Hellebrekers, B.W.J., et al. (2016). Vaccination against Oncoproteins of HPV16 for Noninvasive Vulvar/Vaginal Lesions: Lesion Clearance Is Related to the Strength of the T-Cell Response. *Clin. Cancer Res.* 22, 2342–2350.
- van Poelgeest, M.I.E., Welters, M.J.P., van Esch, E.M.G., Stynenbosch, L.F.M., Kerpershoek, G., van Persijn van Meerten, E.L., van den Hende, M., Löwik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M.A., Fathors, L.M., et al. (2013). HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J. Transl. Med.* 11, 88.
- Poland, G.A., Ovsyannikova, I.G., Jacobson, R.M., and Smith, D.I. (2007). Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 653–664.
- Poland, G.A., Kennedy, R.B., and Ovsyannikova, I.G. (2011). Vaccinomics and Personalized Vaccinology: Is Science Leading Us Toward a New Path of Directed Vaccine Development and Discovery? *PLoS Pathog.* 7.
- Prabhu, P.R., Jayalekshmi, D., and Pillai, M.R. (2012). Lung Cancer and Human Papilloma Viruses (HPVs): Examining the Molecular Evidence. *J. Oncol.* 2012, 750270.
- Pujol, J.-L., Vansteenkiste, J.F., De Pas, T.M., Atanackovic, D., Reck, M., Thomeer, M., Douillard, J.-Y., Fasola, G., Potter, V., Taylor, P., et al. (2015). Safety and Immunogenicity

of MAGE-A3 Cancer Immunotherapeutic with or without Adjuvant Chemotherapy in Patients with Resected Stage IB to III MAGE-A3-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *10*, 1458–1467.

Pujol, J.-L., De Pas, T., Rittmeyer, A., Vallières, E., Kubisa, B., Levchenko, E., Wiesemann, S., Masters, G.A., Shen, R., Tjulandin, S.A., et al. (2016). Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapeutic in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 2208–2217.

Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.-H., Yavlovich, A., Heldman, E., and Blumenthal, R. (2009). Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* *26*, 523–580.

Q

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.

Quoix, E., Ramlau, R., Westeel, V., Papai, Z., Madroszyk, A., Riviere, A., Koralewski, P., Breton, J.-L., Stoelben, E., Braun, D., et al. (2011). Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* *12*, 1125–1133.

R

Reiser, J., and Banerjee, A. (2016). Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J. Immunol. Res.* *2016*.

Rhee, J.H., Lee, S.E., and Kim, S.Y. (2012). Mucosal vaccine adjuvants update. *Clin. Exp. Vaccine Res.* *1*, 50–63.

Ribatti, D. (2016). The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget* *8*, 7175–7180.

Ricupito, A., Grioni, M., Calcinotto, A., Hess Michelini, R., Longhi, R., Mondino, A., and Bellone, M. (2013). Booster vaccinations against cancer are critical in prophylactic but detrimental in therapeutic settings. *Cancer Res.* *73*, 3545–3554.

del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *178*, 6861–6866.

Romero, P., Banchereau, J., Bhardwaj, N., Cockett, M., Disis, M.L., Dranoff, G., Gilboa, E., Hammond, S.A., Hershberg, R., Korman, A.J., et al. (2016). The Human Vaccines Project: A roadmap for cancer vaccine development. *Sci. Transl. Med.* *8*, 334ps9-334ps9.

Rosalia, R.A., Quakkelaar, E.D., Redeker, A., Khan, S., Camps, M., Drijfhout, J.W., Silva, A.L., Jiskoot, W., van Hall, T., van Veelen, P.A., et al. (2013). Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2554–2565.

Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* *348*, 62–68.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* *10*, 909–915.

Roth, A., Espuelas, S., Thumann, C., Frisch, B., and Schuber, F. (2004). Synthesis of thiol-reactive lipopeptide adjuvants. Incorporation into liposomes and study of their mitogenic effect on mouse splenocytes. *Bioconjug. Chem.* *15*, 541–553.

Roth, A., Rohrbach, F., Weth, R., Frisch, B., Schuber, F., and Wels, W.S. (2005). Induction of effective and antigen-specific antitumour immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct. *Br. J. Cancer* *92*, 1421–1429.

Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2008). Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* *18*, 560–574.

S

Saliba, H., Heurtault, B., Bouharoun-Tayoun, H., Flacher, V., Frisch, B., Fournel, S., and Chamat, S. (2017). Enhancing tumor specific immune responses by transcutaneous vaccination. *Expert Rev. Vaccines* *16*, 1079–1094.

Salomon, B.L., Leclerc, M., Tosello, J., Ronin, E., Piaggio, E., and Cohen, J.L. (2018). Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front. Immunol.* *9*, 444.

Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Mühlradt, P.F., Takeda, K., and Akira, S. (2000). Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways. *J. Immunol.* *165*, 7096–7101.

Saupe, A., McBurney, W., Rades, T., and Hook, S. (2006). Immunostimulatory colloidal delivery systems for cancer vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.* *3*, 345–354.

Scheel, B., Braedel, S., Probst, J., Carralot, J.-P., Wagner, H., Schild, H., Jung, G., Rammensee, H.-G., and Pascolo, S. (2004). Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur. J. Immunol.* *34*, 537–547.

Schmidt, C. (2017). The benefits of immunotherapy combinations.

Schork, N.J. (2015). Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nat. News* *520*, 609.

Schreibelt, G., Tel, J., Sliepen, K.H.E.W.J., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J., and Vries, I.J.M. de (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 1573–1582.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69–74.

Schumacher, T.N., Kesmir, C., and van Buuren, M.M. (2015). Biomarkers in Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell* 27, 12–14.

Schwartzentruber, D.J., Lawson, D.H., Richards, J.M., Conry, R.M., Miller, D.M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., et al. (2011). gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2119–2127.

Schwendener, R.A. (2014). Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines* 2, 159–182.

Segura, E., and Amigorena, S. (2014). Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol. Lett.* 158, 73–78.

Segura, E., and Amigorena, S. (2015). Chapter One - Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 1–31.

Seledtsov, V.I., Goncharov, A.G., and Seledtsova, G.V. (2015). Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 851–869.

Selvanantham, T., Escalante, N.K., Cruz Tleugabulova, M., Fiévé, S., Girardin, S.E., Philpott, D.J., and Mallewaey, T. (2013). Nod1 and Nod2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 5646–5654.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348, 56–61.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723.

Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P.W., Kronenberg, M., and Dubinett, S.M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 5020–5028.

Shen, H., Ackerman, A.L., Cody, V., Giodini, A., Hinson, E.R., Cresswell, P., Edelson, R.L., Saltzman, W.M., and Hanlon, D.J. (2006). Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology* 117, 78–88.

Shortman, K., and Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151–161.

Silva, J.M., Zupancic, E., Vandermeulen, G., Oliveira, V.G., Salgado, A., Videira, M., Gaspar, M., Graca, L., Pr eat, V., and Florindo, H.F. (2015). In vivo delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model. *J. Controlled Release* 198, 91–103.

- Skwarczynski, M., Zaman, M., Urbani, C.N., Lin, I.-C., Jia, Z., Batzloff, M.R., Good, M.F., Monteiro, M.J., and Toth, I. (2010). Polyacrylate Dendrimer Nanoparticles: A Self-Adjuvanting Vaccine Delivery System. *Angew. Chem. Int. Ed.* *49*, 5742–5745.
- Slingluff, C.L. (2011). The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination? *Cancer J. Sudbury Mass* *17*, 343–350.
- Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Chianese-Bullock, K.A., Smolkin, M.E., Ross, M.I., Haas, N.B., von Mehren, M., and Grosh, W.W. (2011). Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multipptide melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 2924–2932.
- Slingluff, C.L., Petroni, G.R., Olson, W.C., Smolkin, M.E., Chianese-Bullock, K.A., Mauldin, I.S., Smith, K.T., Deacon, D.H., Varhegyi, N.E., Donnelly, S.B., et al. (2016). A randomized pilot trial testing the safety and immunologic effects of a MAGE-A3 protein plus AS15 immunostimulant administered into muscle or into dermal/subcutaneous sites. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *65*, 25–36.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. In *Advances in Immunology*, (Academic Press), pp. 1–50.
- Soares, K.C., Rucki, A.A., Wu, A.A., Olino, K., Xiao, Q., Chai, Y., Wamwea, A., Bigelow, E., Lutz, E., Liu, L., et al. (2015). PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *J. Immunother. Hagerstown Md* *1997* *38*, 1–11.
- Spanedda, M.V., De Giorgi, M., Hassane, F.S., Schuber, F., Bourel-Bonnet, L., and Frisch, B. (2017). Coupling of Ligands to the Liposome Surface by Click Chemistry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1522*, 93–106.
- Spies, B., Hochrein, H., Vabulas, M., Huster, K., Busch, D.H., Schmitz, F., Heit, A., and Wagner, H. (2003). Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *171*, 5908–5912.
- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., Dubinett, S., et al. (2012). Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer. *PLOS ONE* *7*, e40677.
- Stark, F.C., McCluskie, M.J., and Krishnan, L. (2016). Homologous Prime-Boost Vaccination with OVA Entrapped in Self-Adjuvanting Archaeosomes Induces High Numbers of OVA-Specific CD8⁺ T Cells that Protect Against Subcutaneous B16-OVA Melanoma. *Vaccines* *4*.
- Stern, S.T., and McNeil, S.E. (2008). Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicol. Sci.* *101*, 4–21.
- Storni, T., Kündig, T.M., Senti, G., and Johansen, P. (2005). Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 333–355.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 9–20.

Strohl, W.R., and Strohl, L.M. (2012). Chapter 8 - Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. In *Therapeutic Antibody Engineering*, (Woodhead Publishing), pp. 163–595.

Suhrbier, A. (1997). Multi-epitope DNA vaccines. *Immunol. Cell Biol.* *75*, 402–408.

Sun, T., Zhang, Y.S., Pang, B., Hyun, D.C., Yang, M., and Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *53*, 12320–12364.

Szoka, F., and Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 4194–4198.

T

Tada, H., Aiba, S., Shibata, K.-I., Ohteki, T., and Takada, H. (2005). Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells To Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells. *Infect. Immun.* *73*, 7967–7976.

Takada, H., Yokoyama, S., and Yang, S. (2002). Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide. *J. Endotoxin Res.* *8*, 337–342.

Takahashi, Y., Isuzugawa, K., Murase, Y., Imai, M., Yamamoto, S., Iizuka, M., Akira, S., Bahr, G.M., Momotani, E., Hori, M., et al. (2006). Up-Regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF- α in LPS-treated Murine Macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* *68*, 471–478.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* *140*, 805–820.

Tanaka, Y., Taneichi, M., Kasai, M., Kakiuchi, T., and Uchida, T. (2010). Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8⁺ T Cells. *PLoS ONE* *5*.

Tandrup Schmidt, S., Foged, C., Smith Korsholm, K., Rades, T., and Christensen, D. (2016). Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics* *8*.

Taneichi, M., Ishida, H., Kajino, K., Ogasawara, K., Tanaka, Y., Kasai, M., Mori, M., Nishida, M., Yamamura, H., Mizuguchi, J., et al. (2006). Antigen Chemically Coupled to the Surface of Liposomes Are Cross-Presented to CD8⁺ T Cells and Induce Potent Antitumor Immunity. *J. Immunol.* *177*, 2324–2330.

Temizoz, B., Kuroda, E., and Ishii, K.J. (2016). Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol.* *28*, 329–338.

Teng, M.W.L., Galon, J., Fridman, W.-H., and Smyth, M.J. (2015). From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J. Clin. Invest.* *125*, 3338–3346.

Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2014). The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *63*, 199.

Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.

Thomann, J.-S., Heurtault, B., Weidner, S., Brayé, M., Beyrath, J., Fournel, S., Schuber, F., and Frisch, B. (2011). Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting. *Biomaterials* *32*, 4574–4583.

Thomas, T., Thomas, K., Sadrieh, N., Savage, N., Adair, P., and Bronaugh, R. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VII: evaluating consumer exposure to nanoscale materials. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *91*, 14–19.

Thompson, L.W., Garbee, C.F., Hibbitts, S., Brinckerhoff, L.H., Pierce, R.A., Chianese-Bullock, K.A., Deacon, D.H., Engelhard, V.H., and Slingluff, C.L. (2004). Competition among peptides in melanoma vaccines for binding to MHC molecules. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *27*, 425–431.

Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R.P., Janko, C., Pöttler, M., Dürr, S., and Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *468*, 463–470.

Toes, R.E., Blom, R.J., Offringa, R., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1996). Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 3911–3918.

Torchilin, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* *4*, 145–160.

Touati, W., Tran, T., Seguin, J., Diry, M., Flinois, J.-P., Baillou, C., Lescaille, G., Andre, F., Tartour, E., Lemoine, F.M., et al. (2014). A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response. *Curr. Gene Ther.* *14*, 236–246.

Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179–190.

Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E.J., and Hanash, S.M. (2016). The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Res.* *76*, 5597–5601.

U

Uchida, T., and Taneichi, M. (2014). Application of surface-linked liposomal antigens to the development of vaccines that induce both humoral and cellular immunity. *Jpn. J. Infect. Dis.* *67*, 235–244.

Un, K., Sakai-Kato, K., Oshima, Y., Kawanishi, T., and Okuda, H. (2012). Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes. *Biomaterials* *33*, 8131–8141.

V

- Vacchelli, E., Martins, I., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2012a). Trial watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* *1*, 1557–1576.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012b). Trial watch. *Oncoimmunology* *1*, 894–907.
- Valmori, D., Pessi, A., Bianchi, E., and Corradin, G. (1992). Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 717–721.
- Vansteenkiste, J.F., Cho, B.C., Vanakesa, T., De Pas, T., Zielinski, M., Kim, M.S., Jassem, J., Yoshimura, M., Dahabreh, J., Nakayama, H., et al. (2016). Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 822–835.
- Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2013). Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun.* *13*.
- Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 543–555.
- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* *29*, 352–361.
- Visser, K.E. de, Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 24–37.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 239–252.

W

- Vlad, A.M., Kettel, J.C., Alajez, N.M., Carlos, C.A., and Finn, O.J. (2004). MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. *Adv. Immunol.* *82*, 249–293.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* *27*, 5932–5943.
- Waldowska, M., Bojarska-Junak, A., and Roliński, J. (2017). A brief review of clinical trials involving manipulation of invariant NKT cells as a promising approach in future cancer therapies. *Cent.-Eur. J. Immunol.* *42*, 181–195.
- Walsh, K.P., and Mills, K.H.G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* *34*, 521–530.

- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., et al. (2012). Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* *18*, 1254–1261.
- Wang, T., Zou, M., Jiang, H., Ji, Z., Gao, P., and Cheng, G. (2011). Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. *Eur. J. Pharm. Sci.* *44*, 653–659.
- Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* *6*.
- Ward, J.K., Peretti-Watel, P., and Verger, P. (2016). Vaccine criticism on the Internet: Propositions for future research. *Hum. Vaccines Immunother.* *12*, 1924–1929.
- Watson, D.S., Huang, Z., and Szoka, F.C. (2009). All-trans retinoic acid potentiates the antibody response in mice to a lipopeptide antigen adjuvanted with liposomal lipid A. *Immunol. Cell Biol.* *87*, 630–633.
- Watson, D.S., Endsley, A.N., and Huang, L. (2012). Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* *30*, 2256–2272.
- Weber, J. (2009). Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol. Immunother.* *58*, 823.
- Weber, J.S., Kudchadkar, R.R., Yu, B., Gallenstein, D., Horak, C.E., Inzunza, H.D., Zhao, X., Martinez, A.J., Wang, W., Gibney, G., et al. (2013). Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 4311–4318.
- Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 317–327.
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, L.D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S.A., Iwamoto, F., et al. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1373–1385.
- Wen, F., Ma, J.-H., Yu, H., Yang, F.-R., Huang, M., Zhou, Y.-J., Li, Z.-J., Wang, X.-H., Li, G.-X., Jiang, Y.-F., et al. (2016). A novel M2e-multiple antigenic peptide providing heterologous protection in mice. *J. Vet. Sci.* *17*, 71–78.
- Weon, J.L., and Potts, P.R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *37*, 1–8.
- Wilkins, O., Keeler, A.M., and Flotte, T.R. (2017). CAR T-Cell Therapy: Progress and Prospects. *Hum. Gene Ther. Methods* *28*, 61–66.
- Wolf, B.J., Choi, J.E., and Exley, M.A. (2018). Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* *9*.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., Plaen, E.D., Hankeln, T., Buschenfelde, K.M. zum, and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive

CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281–1284.

Wong, K.K., Li, W.A., Mooney, D.J., and Dranoff, G. (2016). Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. *Adv. Immunol.* 130, 191–249.

Wong, R., Lau, R., Chang, J., Kuus-Reichel, T., Brichard, V., Bruck, C., and Weber, J. (2004). Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 5004–5013.

Worsham, R.D., Thomas, V., and Farid, S.S. (2018). Potential of Continuous Manufacturing for Liposomal Drug Products. *Biotechnol. J.* 0, 1700740.

Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 198, 173–181.

Wylie, B., Seppanen, E., Xiao, K., Zemek, R., Zanker, D., Prato, S., Foley, B., Hart, P.H., Kroczek, R.A., Chen, W., et al. (2015). Cross-presentation of cutaneous melanoma antigen by migratory XCR1+CD103- and XCR1+CD103+ dendritic cells. *Oncoimmunology* 4, e1019198.

X

Xi, W., Ke, D., Min, L., Lin, W., Jiahui, Z., Fang, L., Zhaowei, G., Zhe, Z., Xi, C., and Huizhong, Z. (2018). Incorporation of CD40 ligand enhances the immunogenicity of tumor-associated calcium signal transducer 2 virus-like particles against lung cancer. *Int. J. Mol. Med.* 41, 3671–3679.

Xia, J.-Z., Xie, F.-L., Ran, L.-F., Xie, X.-P., Fan, Y.-M., and Wu, F. (2012). High-intensity focused ultrasound tumor ablation activates autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1363–1371.

Xiang, S.D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P.L., and Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods San Diego Calif* 40, 1–9.

Y

Yamasaki, K., Horiguchi, S., Kurosaki, M., Kunii, N., Nagato, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Ueno, N., Yamamoto, S., Taniguchi, M., et al. (2011). Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin. Immunol.* 138, 255–265.

Yarchoan, M., Johnson, B.A., Lutz, E.R., Laheru, D.A., and Jaffee, E.M. (2017). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* 17, 209–222.

Yildirim, L., Thanh, N.T.K., Loizidou, M., and Seifalian, A.M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* 6, 585–607.

Yoshikawa, T., Okada, N., Tsujino, M., Gao, J.-Q., Hayashi, A., Tsutsumi, Y., Mayumi, T., Yamamoto, A., and Nakagawa, S. (2006). Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor cell-lysate against murine B16BL6 melanoma. *Biol. Pharm. Bull.* *29*, 100–104.

Yu, B., Lee, R.J., and Lee, L.J. (2009). Microfluidic Methods for Production of Liposomes. *Methods Enzymol.* *465*, 129–141.

Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., and Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 736–746.

Z

Zamani, P., Momtazi-Borojeni, A.A., Nik, M.E., Oskuee, R.K., and Sahebkar, A. (2018). Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. *J. Cell. Physiol.* *233*, 5189–5199.

Zarembek, K.A., and Godowski, P.J. (2002). Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *J. Immunol.* *168*, 554–561.

Zarour, H.M., DeLeo, A., Finn, O.J., and Storkus, W.J. (2003). Categories of Tumor Antigens. *Holl.-Frei Cancer Med.* 6th Ed.

Zeng, G., Li, Y., El-Gamil, M., Sidney, J., Sette, A., Wang, R., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. (2002). Generation of NY-ESO-1-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells by a single peptide with dual MHC class I and class II specificities: a new strategy for vaccine design. *Cancer Res.* *62*, 3630–3635.

Zhao, Y., Niu, C., and Cui, J. (2018). Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development? *J. Transl. Med.* *16*.

Zhu, M., Ding, X., Zhao, R., Liu, X., Shen, H., Cai, C., Ferrari, M., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2018). Co-delivery of tumor antigen and dual toll-like receptor ligands into dendritic cell by silicon microparticle enables efficient immunotherapy against melanoma. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *272*, 72–82.

Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 715–727.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* *118*, 1991–2001.

Zou, C., Zhao, P., Xiao, Z., Han, X., Fu, F., and Fu, L. (2016). $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget* *8*, 8900–8909.

Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J.M. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 350–358.



(2015). Cancer Research UK [en ligne]. Worldwide cancer statistics. [consulté le 2018-05-30 à 14:01:03]. Disponible sur <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>.

Développement de constructions liposomiques personnalisables pour une thérapie ciblée du cancer : la vaccination antitumorale

Résumé

Un des enjeux majeurs de la thérapie contre le cancer est le développement d'immunothérapies innovantes ciblées et efficaces sur le long terme. Dans ce but, nous avons tiré profit de la versatilité des liposomes pour concevoir une plateforme vaccinale modulable associant i) un épitope peptidique CD4 universel capable de stimuler les lymphocytes T CD4⁺, ii) un épitope peptidique CD8 dérivé de la tumeur, induisant la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques et iii) un ou des agonistes des récepteurs Toll-like ou NOD-like qui agissent comme des adjuvants en activant les cellules dendritiques.

Après plusieurs étapes de criblage, trois vaccins ont été développés, spécifiques d'un modèle orthotopique de cancer du poumon (TC-1) et différant uniquement par leur adjuvant. Une étude comparative dans un modèle murin a été réalisée. Ces travaux ont permis de comparer leur limite temporelle d'efficacité, de mettre en évidence leur mécanismes immunitaires respectifs et de démontrer la supériorité thérapeutique des liposomes contenant un agoniste du TLR4 (MPLA).

Ces travaux ont montré l'intérêt d'une plateforme liposomique modulable pour la conception de vaccins personnalisés.

Mots-Clefs : vaccins thérapeutiques, cancer, liposomes, peptides, agonistes des récepteurs toll-like et nod-like

Résumé en anglais

Currently, a challenging goal in the area of cancer treatment is the development of innovative targeted antitumoral immunotherapies with a long-term efficiency. In this context, we took advantage of liposomal nanoparticles properties for the conception of a tunable vaccine platform allowing the strategical conception of vaccines containing: i) a CD4 epitope peptide able to stimulate CD4⁺ T helper cells ii) a tumor CD8 epitope peptide, which induces the differentiation of CD8⁺ T cells in cytotoxic T cells and iii) Toll or Nod-Like receptor agonist(s), which act as adjuvant for the activation of dendritic cell

After several screening steps, three vaccines, specific targeting an orthotopic lung tumor model (TC-1) and differing only by their adjuvant composition, were successfully developed. Subsequently, a comparative study of their efficacy time limit and their immunologic mode of action was performed. This study showed the therapeutic supremacy of liposomal vaccines containing a TLR4 agonist (MPLA).

In this work, we demonstrated the value of a customizable liposomal platform for the conception of personalized vaccines and we highlighted the necessity of immune monitoring for a better understanding of vaccines impact and the prediction of their efficacy.

Keywords : therapeutic vaccines, cancer, liposomes, peptides, toll-like and nod-like receptors agonists