



HAL
open science

Développement de nano-anticorps antagonistes du point de contrôle immunitaire ILT4 pour une application en immunothérapie antitumorale

Raphaëlle Dréan

► **To cite this version:**

Raphaëlle Dréan. Développement de nano-anticorps antagonistes du point de contrôle immunitaire ILT4 pour une application en immunothérapie antitumorale. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS446 . tel-04375912

HAL Id: tel-04375912

<https://theses.hal.science/tel-04375912v1>

Submitted on 6 Jan 2024

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.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant (CdV ED515)

Plateforme d'Ingénierie des Anticorps, Institut Pasteur de Paris & Société INVECTYS

Développement de nano-anticorps antagonistes du point de contrôle immunitaire ILT4 pour une application en immunothérapie antitumorale

Thèse de doctorat de Microbiologie et Immunologie

Raphaëlle Dréan

Dirigée par le Dr. Pierre Lafaye

Co-encadrée en entreprise par la Dr. Maria Loustau, en convention Cifre (ANRT)

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2022,

à l'Institut Pasteur de Paris

Devant un jury composé de :

Pr. Chahrazade El Amri, Professeure, Sorbonne Université	Présidente du jury
Dr. Laurence Amiot, MCU-PH, Université de Rennes	Rapporteuse
Dr. Pierre Martineau, Directeur de Recherche, IRCM, Montpellier	Rapporteur
Pr. Etienne Weiss, Professeur, ESBS, Strasbourg	Examineur
Dr. Pierre Lafaye, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Directeur de thèse
Dr. Maria Loustau, Directrice R&D, Invectys, Paris	Encadrante de thèse



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, Laurence Amiot et Pierre Martineau, d'avoir accepté de lire mon manuscrit pour apporter leurs regards extérieurs sur mes travaux. Je remercie également Etienne Weiss et Chahrazade El Amri, d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Chahrazade, je tiens à vous remercier également pour le rôle important que vous avez tenu au cours de ma thèse en tant que membre de mon comité de suivi, avec Encarnita Mariotti-Ferrandiz et Emmanuel Donnadiou.

Un immense merci à mon directeur de thèse, Pierre Lafaye, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire à l'issue de ma première année de thèse. Je te remercie pour ton excellent encadrement, tant sur les plans scientifique qu'humain, par ton expertise, ta disponibilité et tes encouragements. Merci d'avoir guidé mes travaux, puis la rédaction de cette thèse.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe de la Plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur avec qui j'ai beaucoup apprécié collaborer. Gabriel Aymé, merci d'avoir su identifier le merveilleux VHH B8, véritable aiguille dans la botte de foin qu'est la banque d'ADNc d'Alpamayo ! Et pour nos discussions de sciences (et autres). Merci également à Véronique Mériaux et Gaëlle Chauveau pour votre aide dans le laboratoire.

Et un grand merci à tous les membres d'Invectys, Alix Jacquier, Martin Lecomte, Odessa Fayet, Julie Garibal, Marion Julithe, Marie Escande, Tama Charlorin, Benoit Giroux, Valérie Doppler, Nathalie Yared, Natalia Colomar Carando, David Espie, Nicolas Duthoit, Renaud Perret, Justine Heidrich, Caroline Blaison, Maria Loustau, Julien Caumartin et François Lescure, avec qui j'ai toujours apprécié échanger lors de mes venues à l'entreprise.

Merci à Maria d'avoir été présente depuis le début de ma thèse. Julien, merci de m'avoir mis le pied à l'étrier pour réaliser ma thèse avec Invectys.

A la team B8, Alix et Odessa-Maud (☺) un immense merci pour votre aide sur les manip cellulaires ! J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous. Alix, merci pour tes conseils scientifiques, nos discussions métaphysiques sur le monde lors du congrès à Hamburg et surtout ta visite guidée du plus beau quartier de la ville ...

Un grand merci à Martin Lecomte, aussi connu comme le couteau suisse-loire-atlantico-breton d'Invectys, entre autres pour les lentivirus ILT4 et cette fameuse lignée de cellules qui t'aura donné du fil à retordre ! Et aussi pour ta bonne humeur de E, ta disponibilité et ton esprit d'équipe.

Et merci à tous pour votre soutien et votre bonne humeur communicative, qui m'ont aidée quand j'ai eu des petites baisses de motivation !

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide à l'issue de ma première année, afin que la suite de ma thèse se déroule au mieux :

Nadia Izadi-Pruneyre, merci pour ton écoute, ton soutien et ta réactivité lorsque j'en ai eu besoin.

L'équipe de l'Enseignement et du Tutorat de l'Institut Pasteur, Monica Sala, Olivier Cassar et Karin Eiglmeier. Merci pour votre soutien et votre investissement dans cette mission d'accompagnement des doctorants, qui se révèle parfois nécessaire.

Merci à l'équipe de la Plateforme de production et Purification des Protéines recombinantes de l'Institut Pasteur, Stéphane Pétres, François Dejardin, Evelyne Dufour, Christophe Thomas, Lucie Cappuccio, Angélique Dalleau Mireille Nowakowski pour leur accueil chaleureux et leur expertise qui m'a beaucoup servie au cours de mon projet. Merci notamment à Stéphane pour ton partage d'expérience en protéines recombinantes, et à François, Evelyne et Christophe de m'avoir formée sur différentes techniques. Je garde un super souvenir des journées départementales au Pouliguen !

Ahmed Haouz, je te remercie pour ta pédagogie et d'avoir pris le temps de partager avec moi ta passion pour la cristallographie. Même si nous n'avons pour l'instant pas résolu la structure, j'ai découvert le monde de la biologie structurale et beaucoup apprécié cette partie de mon projet.

Merci à Francina Langa-Vives et à Harald Kranz d'avoir partagé avec moi leur expertise dans la génération de souris transgéniques.

A l'équipe (anciennement) de l'URM : Jean-Pierre Vartanian, Vincent Caval, Rodolphe Suspene, Pierre Khalfi, Noémie Berry, Kyle Raymond, Valérie Thiers et Florence Jeannot. Merci de m'avoir accueillie pour ma première année tumultueuse, que vous m'avez aidée à surmonter. Particulièrement, merci à Jean-Pierre Vartanian pour tes conseils avisés. Vincent Caval le marabout, merci pour ta bonne humeur permanente, et d'avoir accepté de partager avec moi un peu de tes pouvoirs magiques de biologie moléculaire, dont je me suis servie tout au long de ma thèse. Rodolphe Suspene, merci de m'avoir initiée au Pensak Silat et de m'avoir donné des coups de mains avec mon potager. Kyle, thanks for the Mont St Michel, I now know not to bring a spoon on a bike trip! I wish you the best for the rest of your PhD.

Mille fois merci à mes amies Louana et Alexane, d'avoir suivi ce long feuilleton plein de rebondissements, de m'avoir écoutée et re-re écoutée parler en boucle de cette sacrée thèse. Votre présence et votre soutien m'ont tellement aidée, merci ! Et merci à tous les autres Margaux, Agathe, Horthense, Charlène, Manon, Nathan, Noémie d'avoir partagé avec moi les moments de joie et ceux plus difficiles de ces trois dernières années.

Emmanuel, dankon pri akompanigis min dum ci tiu periodo. Et pour avoir cherché avec moi une solution à tout, comme tu aimes tant faire.

Un énorme merci à ma famille ! Mes parents, Clarisse, Paul, Babu, Frank, Bertrand Sophie et Benoit, merci d'avoir été présents pour moi tout au long de ma thèse.

Peio, un immense merci pour ta présence, tes attentions et tes surprises qui m'ont tant aidée durant ces derniers mois. Et merci pour ta patience.

En somme, merci à tous d'avoir rendu cette aventure si enrichissante pour moi !

Table des matières

Remerciements.....	2
Abréviations.....	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Introduction de l'étude.....	11
I. Introduction à l'immunothérapie anti-cancéreuse.....	11
1) Le développement tumoral et le microenvironnement	12
a. Les « hallmarks » du cancer	12
b. Inflammation et cancer.....	12
c. La structure du microenvironnement tumoral	13
d. Le système immunitaire dans la réponse antitumorale et la découverte des points de contrôle immunitaires (PCI)	15
2) Les thérapies à anticorps monoclonaux bloquant des points de contrôle immunitaires.....	19
a. Développement des anticorps monoclonaux en thérapie anticancéreuse	19
b. Les premiers points de contrôle immunitaires étudiés : PD1/PD-L1 et CTLA-4	23
c. Les cellules immunosuppressives dans le TIME.....	26
d. Les principaux nouveaux points de contrôle immunitaires actuellement étudiés	30
II. ILT4, un nouveau point de contrôle immunitaire	35
1) Un récepteur inhibiteur du système immunitaire	35
a. Structure	35
b. Un récepteur de la tolérance périphérique	37
c. Les ligands d'ILT4	38
d. Régulation de l'expression d'ILT4	40
e. Expression d'ILT4 dans le cancer.....	40
2) ILT4, un point de contrôle immunitaire (axe HLA-G/ILT4)	42
a. HLA-G, une molécule inhibitrice	42
b. Mécanismes et conséquences de l'inhibition par HLA-G d'ILT4 sur les myéloïdes	44
c. Les cancers exprimant le point de contrôle immunitaire HLA-G/ ILT4	45
3) ILT4, un antigène associé aux tumeurs (axe ANGPTL2/ILT4)	46
a. ANGPTL2, une molécule pro-inflammatoire	46
b. Le rôle de l'ANGPTL2 dans le cancer	48
4) Cibler ILT4 en immunothérapie antitumorale	49

III.	Les VHH, des formats d'anticorps alternatifs.....	52
1)	L'origine des VHH.....	52
a.	La découverte des anticorps à chaîne lourde de camélidés	52
b.	La structure des IgG conventionnels et homodomériques	53
c.	Sélection de VHH par criblage haut débit d'une banque d'ADN.....	56
2)	Les propriétés des VHH et leurs applications.....	57
a.	Stabilité	57
b.	Epitopes reconnus.....	57
c.	Faible immunogénicité.....	58
d.	Facilité de production	58
e.	Faible demi-vie, un atout en imagerie	59
f.	Expression intracellulaire	60
g.	Passage de la barrière hématoencéphalique.....	60
h.	Pénétration des tissus.....	61
3)	La facilité d'ingénierie des VHH permet la génération de formats d'anticorps innovants	63
a.	La génération d'immunotoxines ou de conjugués anticorps-médicaments	65
b.	La génération de formats d'anticorps multifonctionnels.....	66
c.	Augmenter la demi-vie des VHH pour des applications thérapeutiques	67
4)	Des VHH bloquant des points de contrôle immunitaires.....	69
	Les objectifs de l'étude	72
	Résultats	73
I.	Développement d'un VHH antagoniste d'ILT4 capable d'inhiber <i>in vitro</i> la polarisation de macrophages en phénotype M2 pro-tumoral	73
1)	Caractérisation des VHH anti-ILT4	73
2)	Étude de la conséquence de la dimérisation des VHH sur leur fonctionnalité	80
3)	Étude de la capacité des VHH à bloquer l'interaction entre HLA-G6 et l'ANGPTL2 avec ILT4	83
4)	Études fonctionnelles des trois formats du VHH B8	90
a.	Étude de l'effet antagoniste ou agoniste du VHH B8.....	90
b.	Inhibition de la polarisation de macrophages vers un phénotype M2 pro-tumoral par le VHH B8	94
5)	Conclusions et perspectives de la première partie expérimentale.....	99
II.	Criblage de cristallogénèse du complexe VHH B8/ILT4-ECD.....	102
1)	L'objectif de l'étude	102
2)	La mise en place de la méthode de production et purification d'ILT4-ECD, et la validation de la protéine produite	103

3) La production d'ILT4-ECD pour la formation du complexe avec le VHH-B8	106
4) Purification du complexe VHH B8/ILT4 ECD par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)	109
5) Criblage de cristallogénèse	112
6) Conclusions et perspectives de la deuxième partie expérimentale.....	116
Discussion	118
Conclusion	133
Résultats annexes	134
Matériel et Méthodes.....	157
Bibliographie	180
Abstract.....	201
Résumé	201

Abréviations

aAPC : artificial Antigen Presenting Cell / cellule artificiellement présentatrice d'antigènes

AAT : antigènes associés aux tumeurs

AcM : anticorps monoclonal

ADCC : antibody dependant cellular toxicity/toxicité cellulaire dépendante des anticorps

AID : activation induced cytidine deaminase

CAF : cancer associated fibroblats / fibroblastes associés aux cancers

CDC : complement dependant cellular toxicity/toxicité cellulaire dépendante du complément

CDR : complementary determining region / région déterminant la complémentarité

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice des Antigènes

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte / Lymphocyte T Cytotoxique

CXCL : Chemokine C-X-C motif Ligand

DC : dendritic cell / cellule dendritique

EGFR : epithelial growth factor receptor / récepteur du facteur de croissance épithéliale

Fc : Fragment cristallisable des anticorps

FcR : récepteur au Fc

FcRn : Récepteur au Fc néonatal

FDA : Food and Drug Administration

GFP : Green Fluorescent Protein / protéine fluorescente verte

hcAb : Homodimeric Camelid Antibody / Anticorps homodimérique des camélidés

HLA-G : Human Leukocyte Antigen G

IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase

ILT : Ig-like Transcript

INF : Interferon

iNOs : oxide nitrique synthase

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIMs : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

K_D : constante de dissociation à l'équilibre

LILRBs : Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor subfamily B

LPS : lipopolysaccharides

LT : Lymphocyte T

MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

mM : millimolaire

NK : natural killer

nM : nanomolaire

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer/ Cancer du poumon non à petites cellules

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns / Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PCI : Point de Contrôle Immunitaire

pM : picomolaire

RCC : renal cell carcinoma

RNI : reactive nitrogen intermediates

ROS : reactive oxygen species

TAM : Tumor Associated Macrophage / Macrophage associé aux Tumeurs

TCR : T cell receptor/recepteur des cellules T

TIME : Tumor Immune Micro-Environment/Microenvironnement immunitaire tumoral

TME : Tumor Micro-Environment /Micro-environnement Tumoral

TNF : Tumor Necrosis Factor

μM : micromolaire

SCLC : small cell lung cancer

VEGF/R : vascular endothelial growth factor/Receptor

VH : Variable Heavy chain

VL : Variable Light Chain

Liste des figures

Figure 1 : Inflammation et cancer.....	13
Figure 2 : Représentation de la structure du microenvironnement tumoral et du dialogue entre les cellules qui le composent	15
Figure 3 : Théorie des 3E. L'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales évolue en trois phases qui peuvent aboutir à l'échappement immunitaire.....	16
Figure 4 : Mécanismes d'actions antitumorales des anticorps monoclonaux.....	22
Figure 5 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux bloquant CTLA/4 et PD-1/PD-L1	24
Figure 6 : Représentation schématique de la polarisation des cellules myéloïdes et des conséquences pour le TME.....	27
Figure 7 : Polarisation et rôle des macrophages dans le microenvironnement tumoral.....	29
Figure 8 : De nouveaux points de contrôle immunitaires identifiés entre les CPA, les cellules T ou les cellules tumorales dans le TME	31
Figure 9 : La structure des récepteurs de la famille des ILTs (ou LILRBs).....	36
Figure 10 : La voie de signalisation des récepteurs ILT inhibiteurs (LILRB) et activateurs (LILRA).....	37
Figure 11 : Structure génétique et protéique des différentes isoformes de HLA-G	43
Figure 12 : Les voies de signalisation activées par l'ANGPTL2 après fixation à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou à l'ILT4.....	47
Figure 13 : Représentation schématique de l'implication d'ILT4 dans le développement tumoral.	51
Figure 14 : Comparaison de la structure des IgG conventionnels et des hcAb de camélidés.	54
Figure 15 : Structure des gènes IGHV et structure protéique d'un VHH	55
Figure 16 : Corrélation entre la taille d'un anticorps et la pénétration tumorale	62
Figure 17 : Résumé des méthodes de génération des VHH, de leurs propriétés et applications.....	63
Figure 18 : Exemples de formats d'anticorps à partir de VHH étudiés en immunothérapie et imagerie	65
Figure 19 : La diversité des formats VHH actuellement en essais cliniques	71
Figure 20 : Classification des VHH anti-ILT4 par homologie de séquence protéique	74
Figure 21 : Caractérisation de l'affinité des VHH pour ILT4	75
Figure 22 : Étude de la réactivité croisée des VHH pour les récepteurs ILT2 et PIR-B.....	77
Figure 23 : Dimérisation des VHH et conséquences sur leur fixation à l'ILT4	82
Figure 24 : Mise au point de l'ELISA de compétition.	84
Figure 25 : Comparaison de la capacité de blocage de l'interaction entre ILT4 et ANGPTL2 par les VHH-Fc anti-ILT4. (ELISA de compétition)	85
Figure 26 : Étude de la capacité d'inhibition de l'interaction entre ILT4 et ses deux ligands par les trois formats du VHH B8, et comparaison à deux anticorps anti-ILT4 de référence... ..	86
Figure 27: Validation de la compétition entre B8 et HLA-G6-mFc pour la fixation à l'ILT4 exprimé à la surface des cellules H1299-ILT4	89
Figure 28 : Étude de l'effet antagoniste du VHH B8 sur le récepteur ILT4	92
Figure 29 : Inhibition de la différenciation <i>in vitro</i> de macrophages en phénotype M2 pro-tumoral par les VHH B8 et B8-B8.....	96
Figure 30 : Comparaison de l'efficacité d'inhibition de la différenciation en macrophage M2 entre le format monomérique et dimérique de B8	98

Figure 31 : Développement du procédé de production et caractérisation de la protéine ILT4-ECD.....	105
Figure 32 : Production et purification d'ILT4-ECD pour le criblage de cristallogénèse	108
Figure 33 : Purification du complexe ILT4/B8 pour le criblage de cristallogénèse	110
Figure 34 : Analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS) de l'échantillon du complexe ILT4-VHH B8 après concentration.....	112
Figure 35 : Exemple des différents résultats obtenus à l'issu d'un criblage de cristallogénèse.	113
Figure 36 : Analyse des cristaux formés lors du 1 ^{er} criblage de cristallogénèse	114
Figure 37 : Résumé des caractéristiques et du mode d'action du VHH B8 anti-ILT4 développé dans ces travaux de thèse.....	132
Figure 38. Purification de HLA-G6-mFc produit dans le système ExpiHEK293	136
Figure 39 : Expression d'ILT4 par différentes lignées de cellules tumorales.	137
Figure 40 : Analyse des lignées cellulaires A549 et H1299 pour l'expression d'ILT4	140
Figure 41 : Étude de l'impact de la déglycosylation et dénaturation d'ILT4-ECD sur l'affinité de B8.....	144
Figure 42 : Analyse de l'expression des CMH-I sur les macrophages M2-like contrôles à jour 7 du protocole de différenciation.....	145
Figure 43 : schéma du procédé de génération de souris transgéniques par insertion de transgène	148
Figure 44 : Présentation de la stratégie d'intégration ciblée du transgène par recombinaison homologue.....	149
Figure 45 : (1) Criblage des cellules souches embryonnaires pour la génération d'une lignée de souris ILT4+ PIRB-.....	152
Figure 46 : (2) Criblage des cellules souches embryonnaires pour la génération d'une lignée de souris ILT4+ PIRB-.....	154
Figure 47 : Courbe d'association et de dissociation entre les VHH et ILT4-hFc.	156
Figure 48 : Illustration de la PCR 1 pour la génération des ADNc des régions VH/CH2 des anticorps	158
Figure 49 : Illustration de la structure d'un phage exprimant un VHH.	160
Figure 50 : Représentation des ELISA.	169
Figure 51 : ELISA indirect pour évaluer la réactivité croisée des VHH pour ILT2 ou PIR-B....	169
Figure 52 : ELISA de compétition entre les anticorps anti-ILT4 et l'ANGPTL2 ou HLA-G6-mFc pour la fixation à l'ILT4.....	170
Figure 53 : Principe de la cristallisation des protéines par méthode de diffusion de vapeur en gouttes assises	171
Figure 54 : Processus de détermination de la structure tridimensionnelle d'une protéine par cristallographie	172
Figure 55 : Protocole de différenciation des monocytes en macrophages M1 ou M2	175
Figure 56 : Processus pour la génération d'une lignée de souris transgéniques ILT4+ PIR-B-.....	177

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux types et exemples de thérapies ciblées utilisant des anticorps monoclonaux	21
Tableau 2 : Alignement des séquences des VHH avec les gènes V D J d'alpaga (Vicugna pacos, base de données IMGT)	79
Tableau 3 : Estimation de la concentration médiane inhibitrice (IC50) des trois formats du VHH B8 et de l'anticorps 27D6.....	86
Tableau 4: Tableau récapitulatif des modes de production des différentes protéines recombinantes	165
Tableau 5 : Liste des anticorps et protéines recombinantes commerciales utilisées	179

Introduction de l'étude

I. Introduction à l'immunothérapie anti-cancéreuse

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde, après les maladies cardiovasculaires, et la première cause dans les pays développés (Dagenais et al. 2020). Son incidence ne cesse d'augmenter, en raison notamment du vieillissement et des modes de vie de la population mondiale (Falzone et al. 2018). En plus de l'ablation chirurgicale, l'arsenal thérapeutique s'est enrichi au cours du temps grâce à trois révolutions technologiques. D'abord la radiothérapie, mise au point au début du XX^{ème} siècle par Marie et Pierre Curie. Ensuite, la chimiothérapie grâce à la découverte dans les années 50 de composés cytotoxiques. Enfin, dans les années 80 les thérapies ciblées ont été développées, et en particulier l'immunothérapie grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM). Les stratégies thérapeutiques sont définies et adaptées pour chaque patient selon de nombreux facteurs tels que l'organe atteint, le stade de développement du cancer ou encore la présence de biomarqueurs pronostiques, et ces différentes stratégies thérapeutiques sont souvent utilisées en combinaison.

La révolution de l'immunothérapie réside dans le fait qu'elle agit sur le système immunitaire, afin de restaurer sa capacité à reconnaître et détruire lui-même les cellules tumorales. Ces thérapies ont permis d'augmenter la survie des patients tout en diminuant certains effets secondaires lourds liés à la toxicité des chimiothérapies, mais elles présentent également certaines limitations qui restent à surmonter (Seidel, Otsuka, and Kabashima 2018).

De toute évidence, le cancer est une maladie complexe, et il existe de multiples approches pour la définir et développer de nouveaux axes thérapeutiques. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une molécule impliquée dans l'homéostasie immunitaire en contexte physiologique, mais identifiée en contexte pathologique pour son rôle dans l'échappement tumoral et la mise en place du microenvironnement suppresseur. L'objectif de cette thèse a donc été de développer une nouvelle immunothérapie visant à neutraliser ce mécanisme d'échappement tumoral et ainsi restaurer l'immunité antitumorale. Il est nécessaire, pour introduire ces travaux de thèse, de comprendre le rôle du microenvironnement tumoral, le concept des points de contrôle immunitaires et l'avènement des immunothérapies ciblées grâce aux anticorps monoclonaux (AcM).

1) Le développement tumoral et le microenvironnement

a. Les « hallmarks » du cancer

En 2000, devant la complexité grandissante de la biologie des cancers, Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont tenté de définir les caractéristiques principales, ou hallmarks en anglais, propres aux cancers (Hanahan and Weinberg, 2000). Ils en citaient à l'époque six : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-croissance, l'invasion des tissus et la formation de métastases, un potentiel de réplication cellulaire illimité, une angiogenèse maintenue et l'échappement à l'apoptose. Les connaissances ont depuis évoluées, et Douglas Hanahan a publié en 2022 une revue (Hanahan, 2022), dans laquelle il étend à dix la liste de ces caractéristiques en intégrant la promotion de l'inflammation par la tumeur, l'instabilité génomique, la dérégulation du métabolisme cellulaire et enfin la capacité des tumeurs à échapper au contrôle du système immunitaire.

b. Inflammation et cancer

L'inflammation intervient aux différents stades du développement tumoral, de l'initiation à la prolifération, ainsi que durant l'invasion, l'angiogenèse et la phase métastatique. Elle peut en être un facteur de risque ou apparaître après le développement de cancers solides, et 20% à 25% des cancers sont liés à une inflammation chronique (Grivennikov et al. 2010). Les causes de cette inflammation sont variées, pouvant être due à des infections chroniques, des facteurs environnementaux ou des maladies métaboliques. On peut citer par exemple le cas des infections chroniques par les virus de l'hépatite B ou C qui augmentent le risque de carcinomes hépatiques ; les risques de cancers du poumons augmentés par leur exposition à la fumée du tabac ou d'autres produits irritants ou encore l'obésité.

Plusieurs mécanismes d'action liant l'inflammation chronique à la mutagénèse ont été avancés : les « reactive oxygen species » (ROS) et « reactive nitrogen intermediates » (RNI) produits par les cellules immunitaires pro-inflammatoires, majoritairement les macrophages et neutrophiles, sont capables d'endommager directement l'ADN (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009). L'activité des enzymes responsables de la correction des mésappariements de l'ADN et des enzymes AID (activation-induced cytidine deaminase) est également altérée par l'inflammation, augmentant le risque de mutations génétiques. Si l'inflammation chronique n'est pas la cause directe de la carcinogénèse, elle intervient dans la majorité des cancers dans

les phases de progression, responsable de modifications génétiques et épigénétiques, de l'angiogenèse et de l'échappement immunitaire (Gonzalez et al. 2018).

L'inflammation et la réponse immunitaire dans le cancer jouent un rôle ambivalent. Ainsi, une inflammation aigüe induite par un vaccin Mycobacterium bovin atténué et administré dans un cancer de vessie, entraîne la réduction de la taille de la tumeur. La phase d'élimination, par les cellules cytotoxiques natural killer (NK) et les lymphocytes T CD8, des cellules cancéreuses les plus immunogènes, permet dans un premier temps de contrôler le développement tumoral. Cependant, elle entraîne la sélection de cellules tumorales peu immunogènes, dès lors capables d'échapper à la surveillance du système immunitaire (Zitvogel et al. 2006). Les mécanismes aboutissant à la mise en place d'une inflammation chronique dans la tumeur sont résumés dans la figure 1 (adaptée de Gonzalez et al. 2018).

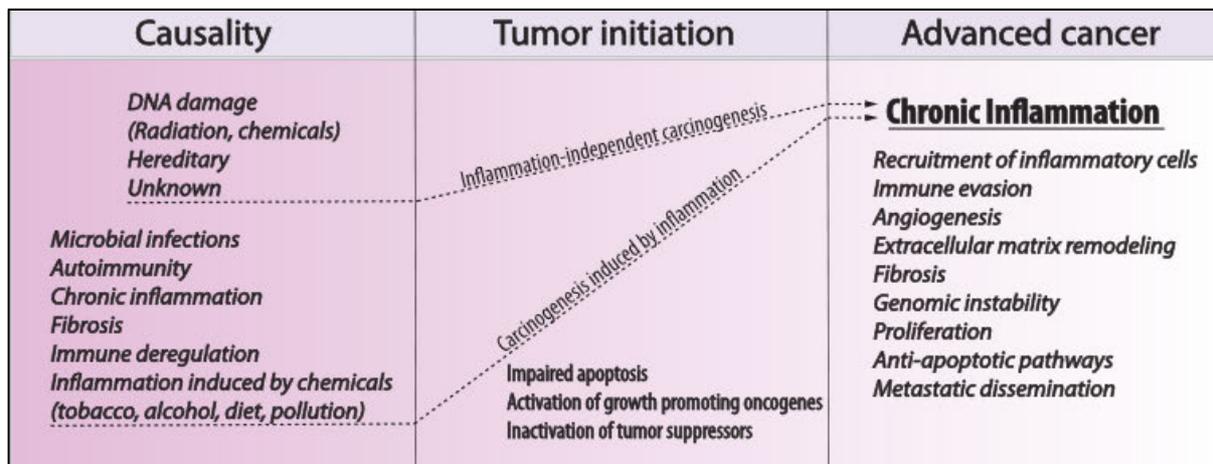


Figure 1 : Inflammation et cancer

Cet exemple permet de mettre en évidence le rôle dichotomique du système immunitaire, pouvant favoriser la résolution de la maladie ou participer à l'échappement tumoral. En particulier, le contexte d'inflammation chronique est un paramètre critique dans le maintien du microenvironnement tumoral (TME).

c. La structure du microenvironnement tumoral

Les tumeurs solides sont un ensemble de différents types cellulaires, dont les fonctions sont détournées par les cellules néoplasiques pour soutenir leur développement. On appelle microenvironnement tumoral (TME) l'ensemble des cellules et des signaux intracellulaires

entourant les cellules tumorales (Balkwill et al. 2012). Les cellules dites « accessoires » du TME, forment la structure de la tumeur et lui permet de proliférer, notamment grâce à la fabrication de la matrice extracellulaire et à la néovascularisation. Ce sont principalement des cellules endothéliales vasculaires et des fibroblastes associés aux cancers (CAFs). Ces dernières sont des cellules du tissu conjonctif responsables entre autres de la formation de la matrice extracellulaire (MEC). Les fibroblastes secrètent aussi des facteurs de croissance de la famille des facteurs de croissance endothéliaux, du TNF β (Tumor Necrosis Factor beta) impliqué dans la suppression des fonctions antitumorales du système immunitaire, ainsi que des molécules chimio-attractante comme CXCL12, qui stimule la croissance tumorale et recrute de nouvelles cellules stromales.

La MEC, constituée majoritairement de collagène et de molécules d'adhésion, assure le support physique pour la croissance et l'invasion des cellules tumorales. La présence de métalloprotéases dans la matrice, responsables de la dégradation des molécules de la MEC, entraîne également une reformation de la matrice (Brassart-Pasco et al. 2020) et lui confère une rigidité augmentée par rapport aux tissus sains. L'environnement tumoral se caractérise aussi par un métabolisme dérégulé. Par exemple : la déplétion du milieu en acides aminés essentiels par des enzymes telles que l'IDO, génère un milieu acidifié dû à une forte concentration de lactate résultant du haut métabolisme cellulaire (Qian et al. 2016). La néovascularisation dans la tumeur est un paramètre critique pour son développement, permettant l'apport de nutriments et les échanges gazeux. Les cellules endothéliales de la vascularisation préexistante sont capables de générer de nouveaux vaisseaux sanguins sous l'impulsion de signaux pro-angiogéniques de la MEC ou dans un contexte d'hypoxie. Certaines thérapies visent à bloquer ces mécanismes de mise en place du TME, par exemple les thérapies ciblant l'IDO ou des facteurs angiogéniques tels que la famille des facteurs de croissance endothélial vasculaire (VEGF en anglais) (Larsen et al. 2011).

La structure du TME et les interactions entre les types cellulaires principaux sont schématisés dans la figure 2 (adaptée de Quail and Joyce, 2013).

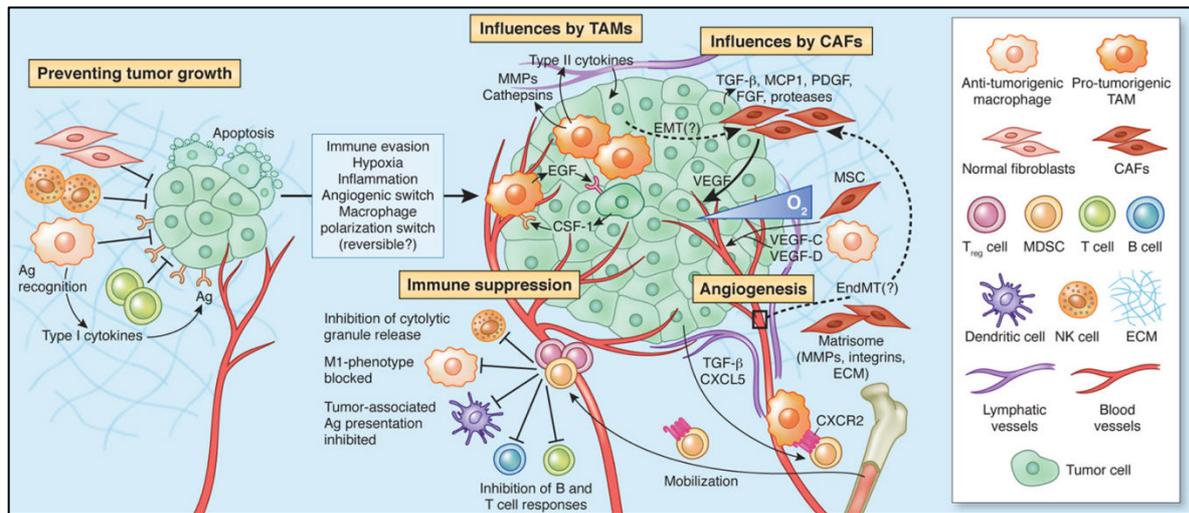


Figure 2 : Représentation de la structure du microenvironnement tumoral et du dialogue entre les cellules qui le composent

Au sein du TME, se trouvent également des cellules immunitaires infiltrées, polarisées vers un phénotype tolérogène et immunosuppresseur, qui constituent le microenvironnement immunitaire tumoral (TIME en anglais). La description de ce compartiment cellulaire sera l'objet d'un chapitre de cette introduction.

Les interactions entre les trois compartiments : cellules tumorales, cellules du TME et cellules du TIME, permettent la mise en place puis le maintien d'un environnement favorable et protecteur pour le développement tumoral (Quail and Joyce, 2013).

d. Le système immunitaire dans la réponse antitumorale et la découverte des points de contrôle immunitaires (PCI)

Le rôle du système immunitaire dans la défense de l'organisme contre les cancers a été pressenti par Paul Ehrlich au début du 20^{ème} siècle, mais ce n'est que dans les années 1960 que les progrès techniques et l'approfondissement des connaissances ont permis à Thomas et Burnet de valider cette hypothèse (Tartour et al. 2011). Ce concept a été étayé par les observations de régression tumorale à la suite d'une inflammation induite par l'administration de pathogènes hautement immunogènes, comme le Bacille de Calmette-Guerin, au cours de l'expérience réalisée par Morales et al. en 1976.

Les études du groupe de Robert D. Schreiber sur des souris immuno-incompétentes ont fini de valider le concept de l'immunité antitumorale. Il observe que la fréquence d'apparition de tumeurs chez des souris immunodéficientes est supérieure à celle de souris saines. De plus, des tumeurs prélevées de souris immuno-incompétentes, régressent à la suite d'une greffe chez des souris immunocompétentes, tandis que ce n'est pas le cas lors de greffes de tumeurs prélevées de souris immunocompétentes. Ceci étaye l'idée que les cellules tumorales ont développé un mécanisme pour échapper à la destruction par le système immunitaire (Fridman et al. 2012), qui a par la suite été conceptualisé sous le nom d'immuno-édition (immuno-editing en anglais) (Schreiber et al. 2011). L'équilibre entre le contrôle immunitaire et le développement tumorale évolue en trois phases théorisées par Schreiber au début des années 2000 : l'élimination, l'équilibre et l'échappement.

Cette théorie des 3E est représentée dans le schéma ci-dessous (extrait de Dunn et al. 2004).

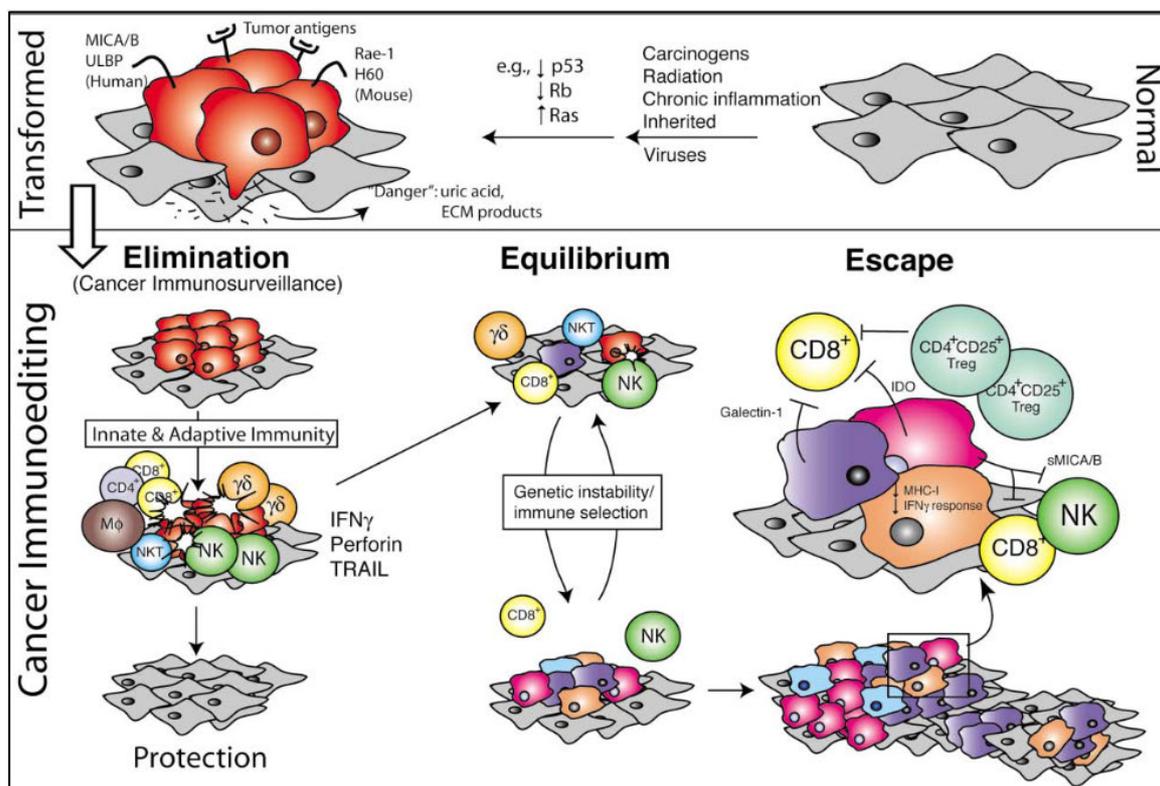


Figure 3 : Théorie des 3E. L'interaction entre le système immunitaire et les cellules tumorales évolue en trois phases qui peuvent aboutir à l'échappement immunitaire.

Il est désormais clairement établi que le système immunitaire prévient la survenue de cancers en contrôlant la prolifération de cellules malignes, notamment via la reconnaissance

d'antigènes spécifiques ou associés aux tumeurs (AAT) par les effecteurs cellulaires cytotoxiques. Dans la première phase, les cellules néoplasiques expriment des néo-antigènes reconnus par le système immunitaire et sont ainsi détruites par les cellules effectrices cytotoxiques, principalement les cellules NK et lymphocytes T CD8+. Le rôle antitumoral ou pro-tumoral des lymphocytes dans le cancer dépend du stade de développement de ce dernier. Dans le premier stade de développement tumoral et à condition que la tumeur soit immunogénique, les lymphocytes sont les premières cellules antitumorales présentes. Les cellules T CD8+, appelés CTL « pour cytolytique T lymphocytes » en anglais, exercent leur activité cytolytique par la sécrétion de granules contenant des perforines et des granzymes après leur activation et recrutement depuis les ganglions lymphatiques (Berke, 1989).

L'activité antitumorale des lymphocytes T est cependant dépendante de deux facteurs principaux : (i) la présence d'AAT contre lesquels ils sont spécifiquement activés et (ii) l'absence de signaux inhibiteurs. Une fois les premières cellules tumorales les plus immunogènes éliminées, les cellules tumorales moins reconnues et exprimant pour certaines des signaux inhibiteurs tel que les PCI, prolifèrent et ainsi échappent à la surveillance des lymphocytes (Palucka and Coussens 2016). Nous reviendrons plus en détail sur ces points de contrôle immunitaires dans la suite de cette introduction.

Plusieurs sous-populations de lymphocytes sont présentes dans le TIME et les pronostiques de survie ou d'évolution favorable chez les patients sont corrélés à leur type de polarisation. La sous-population de lymphocytes T régulateurs classiques (Tregs), caractérisée par l'expression des marqueurs FOXP3 et CD25 (T CD4+ CD25+ FoxP3+), a un phénotype inhibiteur des fonctions cytotoxiques par l'expression de cytokines immunosuppressives de type Th2 (pour lymphocyte T helper 2), telles que l'IL-10 et le TGF β (Shevryev and Tereshchenko, 2020). Un nombre important de Tregs infiltrés est corrélé à un mauvais pronostic de survie chez les patients dans de nombreux types de tumeurs (Tartour et al. 2011). A l'inverse, l'infiltrat en lymphocyte T de type Th1 sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (INF γ) ou l'IL-2 est un marqueur pronostique de survie des patients. Les lymphocytes T (LT) présentent deux sous populations majeures : les T CD4+ et les T CD8+. Les cellules T de la première sous population, aussi appelés lymphocytes facilitateurs ou "helper" en anglais, ont pour rôle de guider la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines après activation pas des CPA. Les LT CD8+ ont des fonctions cytolytiques liés à leur capacité de sécrétion de perforines et granzymes qui assurent la lyse de la cellule ciblée. Ces derniers LT constituent le second type

cellulaire retrouvé le plus fréquemment dans la tumeur, après les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (Gonzalez et al. 2018).

Les cellules NK, différenciées à partir de la lignée de précurseurs lymphocytaire, ont une activité cytolytique puissante et innée, d'où leur appellation « Natural Killer cells » en anglais et leur affiliation à la réponse immunitaire innée. Contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques, cette fonction n'est pas liée à la reconnaissance d'antigènes spécifiques puis l'activation par des CPA (Vivier et al. 2012). La fonction cytotoxique des NK est régulée par un équilibre entre des récepteurs activateurs, nommés KAR (Killer cell Activatory receptors) possédant différents types de ligands, et des récepteurs inhibiteurs nommés KIR (Killer cell Inhibitory receptor), ces derniers ayant pour ligands les CMH I. En contexte physiologique, un équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs maintient les NK dans un état quiescent, mais cet équilibre est modifié en contexte pathologique et particulièrement via la diminution de l'expression des CMH I par les cellules tumorales.

La deuxième phase de la théorie des 3E, la phase de contrôle de la prolifération tumorale par le système immunitaire, est appelée phase d'équilibre et peut durer de plusieurs mois à plusieurs années. Il arrive cependant que la pression exercée par le système immunitaire, associée à l'instabilité génétique des cellules malignes, entraîne l'émergence de mécanismes biologiques favorisant la prolifération de cellules tumorales. Ces mécanismes de résistance sont par exemple la perte de marqueurs immunogènes et la diminution du taux d'expression des CMH de classe I à la surface des cellules tumorales, ou liées à la sécrétion d'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), une enzyme qui inhibe la prolifération des cellules immunitaires en déplaçant le milieu en tryptophane, ou enfin à la néo-expression de points de contrôle immunitaire (PCI) qui inhibent la réponse immunitaire (Dunn et al. 2004).

C'est le concept d'immunoediting, d'évolution induite directement par le système immunitaire qui aboutit à la troisième phase de la théorie : l'échappement. C'est à ce stade que se mettent en place les mécanismes d'inhibition du système immunitaire par l'expression de points de contrôles immunitaires par les tumeurs, cibles majeures en thérapies cancéreuses actuelles.

La découverte dans les années 1990 du rôle inhibiteur de la réponse T antitumorale de CTLA/4 par James Allison (Chambers et al. 2001) puis de PD-1 par Tasuku Honjo (Iwai et al. 2002), est

à l'origine du concept de point de contrôle immunitaire et a été récompensée par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2018.

L'activation des LT en contexte pathologique, à la suite d'une infection par exemple, puis leur inactivation lors de la résolution de l'inflammation, est orchestrée par plusieurs mécanismes successifs impliquant notamment les cellules présentatrices des antigènes (CPA). Le premier mécanisme est lié à la reconnaissance d'antigènes associés aux CMH de classe I ou II, présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), par les récepteurs des cellules T (TCR), qui induisent un signal activateur. Le deuxième signal d'activation est dépendant de la liaison des récepteurs exprimés par les LT aux molécules de costimulation exprimées, quant à elles, par les CPA. Ceci permet la mise en place des fonctions principales des LT : sécrétion de molécules cytotoxiques par les LT CD8 cytotoxiques et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par des LT CD4 auxiliaires. Concomitamment à cette activation, des molécules inhibitrices sont exprimées à la surface des LT, afin de permettre leur inhibition une fois l'infection contrôlée et maintenir ainsi l'homéostasie des tissus. Ce mécanisme d'inhibition dépend de voies de signalisations spécifiques reposant sur des interactions entre récepteurs inhibiteurs/ligands qu'on appelle points de contrôle immunitaire, et dont la fonction dans le maintien de l'homéostasie est primordiale. Ces mécanismes inhibiteurs puissants sont détournés par les cellules tumorales à leur avantage, et sont les cibles des immunothérapies bloquant ces PCI.

2) Les thérapies à anticorps monoclonaux bloquant des points de contrôle immunitaires

a. Développement des anticorps monoclonaux en thérapie anticancéreuse

Depuis la mise au point de la technique des hybridomes et la génération des premiers anticorps monoclonaux par Kohler et Milstein en 1975, les anticorps monoclonaux (AcM) ont révolutionné les approches thérapeutiques et diagnostiques mais aussi les outils de recherche (Winter and Milstein 1991) (Diallo et al. 2019).

Les AcM sont utilisés dans de nombreuses applications thérapeutiques, dans des maladies vasculaires, inflammatoires, auto-immune ou en oncologie. Ils représentent un intérêt pour l'industrie pharmaceutique : la valeur du marché des AcM était de 150 milliards de dollars en 2019 et est estimée à plus de 300 milliards de dollars en 2025 (Lu et al. 2020). En 2017, les

AcM représentaient 65% de la valeur totale des ventes de produits thérapeutiques (Walsh, 2018).

Les premières tentatives de thérapies utilisant des AcM dans les années 70 n'ont pourtant pas eu le succès espéré, en raison de l'immunogénicité des anticorps murins utilisés, qui entraînait des effets secondaires de type allergiques et avaient une demi-vie courte (Falzone et al. 2018). C'est à la fin des années 80, et grâce aux avancées des technologies de biologie moléculaire et d'analyses génomiques, que les formats d'anticorps humanisés et chimériques, moins immunogènes, ont été développés.

Trois principales stratégies pour l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapie anticancéreuses ont été développées : (i) cibler des antigènes spécifiques des tumeurs pour rediriger la réponse immunitaire effectrice contre les cellules tumorales via la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément (CDCC), (ii) bloquer des mécanismes moléculaires favorisant le développement des tumeurs et du TME, comme la vascularisation de la tumeur, et (iii) inhiber les points de contrôles immunitaires pour neutraliser l'échappement tumoral au système immunitaire (Nuñez-Prado et al. 2015). Les premiers succès d'AcM en thérapies antitumorales ont été des anticorps ciblant directement la tumeur, comme l'AcM anti HER2 (trastuzumab) et l'AcM anti CD20 (rituximab), ainsi que des anticorps ciblant les mécanismes d'angiogenèse comme l'AcM anti-EGF (bevacizumab) (Tartour et al. 2011) (Zahavi and Weiner, 2020). Plusieurs anticorps actuellement utilisés en thérapies antitumorales sont présentées dans le tableau 1 (Zou et al. 2016) (Zahavi and Weiner, 2020).

Mécanisme pro-tumoral ciblé	Type de stratégie thérapeutique	Exemple de cible moléculaire	Exemple de traitements approuvés par la FDA (Food and Drug Administration)
Angiogenèse	Blocage d'une voie de signalisation	VEGF	Bevacizumab : cancer colorectal et du poumon non à petites cellules
Survie cellulaire	Déplétion des cellules tumorales par le système immunitaire ou induction d'apoptose	CD20	Rituximab : lymphome non Hodgkinien
Prolifération cellulaire	Blocage d'une voie de signalisation, induction d'apoptose	EGFR, HER2	Cetuximab : cancer colorectal, tête et cou. Trastuzumab : cancer du sein HER2 positives.
Échappement au système immunitaire	Blocage d'une voie de signalisation, déplétion d'une population cellulaire pro-tumorale	PD1/PD-L1, CTLA-4	Nivolumab et Pembrolizumab : mélanomes et cancers solides métastatiques Atezoluzimab : cancers solide métastatiques

Tableau 1 : Principaux types et exemples de thérapies ciblées utilisant des anticorps monoclonaux

Les mécanismes d'action de ces AcM en thérapies peuvent être directes, par leur capacité à neutraliser ou activer les voies de signalisation liées à leur cible ; ou indirectes, par les fonctions immunitaires intrinsèques des anticorps médiées par la région Fc. L'anticorps cetuximab, par exemple, fonctionne par inhibition de la voie de signalisation induite par la dimérisation de l'EGFR, en inhibant ainsi la prolifération cellulaire et l'apoptose.

En revanche, l'efficacité de certains AcM est liée à la capacité des anticorps à recruter le système immunitaire, par l'activation de la voie de cytotoxicité dépendante du complément

(CDC) ou l'ADCC. C'est le cas par exemple de l'anticorps rituximab, ciblant CD20 dans les lymphomes et dont la perte de fonction activatrice du complément abolit in vitro les effets antitumoraux.

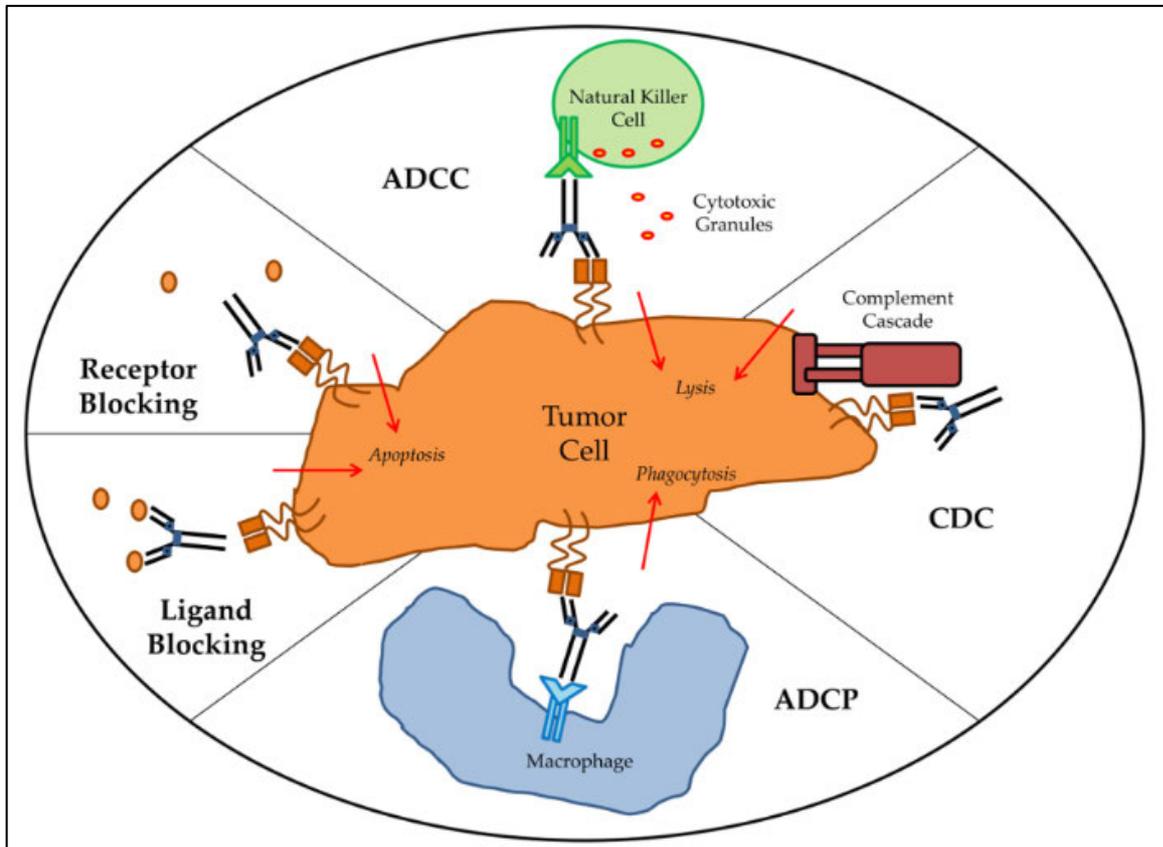


Figure 4 : Mécanismes d'actions antitumorales des anticorps monoclonaux

La spécificité de la réponse immunitaire induite par les anticorps dépend fondamentalement de l'isotype des IgG, pour lesquels les récepteurs aux régions Fc (FcR) ont des affinités et spécificités différentes. Par exemple, l'isotype IgG1 est capable d'induire la meilleure réponse ADCC via l'interaction avec les FcγR activateurs (Kretschmer et al. 2017). La spécificité et l'affinité des régions Fc pour les récepteurs sont dépendantes de leurs motifs de glycosylation et de fucosylation. Dans le but de modifier ces profils, l'ingénierie des domaines Fc permet de moduler les effets ADCC de ces anticorps. Selon le mode d'action souhaité de l'anticorps, ces approches ainsi que le choix de l'isotype sont des points fondamentaux dans la définition de la stratégie thérapeutique.

Bien que les AcM aient révolutionné les thérapies antitumorales ciblées, une limitation à leur efficacité reste la faible pénétration tumorale et l'hétérogénéité de la distribution intratumorale (Minchinton et al. 2006). Ceci est en partie dû à la structure complexe des tissus tumoraux, qui présentent une vascularisation anormale, une matrice extracellulaire très rigide et la présence de tissus fibreux, ainsi que la haute pression fluidique interstitielle, autant de paramètres limitant la diffusion des anticorps dans les tissus. Des stratégies pour augmenter leur pénétration, notamment par l'utilisation de formats d'anticorps innovants, sont étudiées et seront abordées par la suite dans cette introduction.

b. Les premiers points de contrôle immunitaires étudiés : PD1/PD-L1 et CTLA-4

Les premiers points de contrôles immunitaires décrits, et majoritairement étudiés depuis 20 ans sont CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated antigen 4) et PD-1 (Programmed cell Death 1) PD-L1 (Programmes cell Death Ligand 1) (Chambers, Allison et al. 2001 ; Iwai et al. 2002). Ils sont actuellement ciblés par des immunothérapies anti-cancéreuses.

CTLA-4 entre directement en compétition avec la molécule de costimulation CD28, pour la fixation aux molécules CD80/86 présentes sur les CPA, et régule négativement l'activation du TCR à la surface de cellules T naïves ou au repos (Figure 5 adaptée de Dubois et al. 2019). PD-1 est exprimé à la surface des LT activés, et son interaction avec les ligands PD-L1 ou PD-L2 exprimés par les cellules dendritiques, entraîne également une inhibition du signal activateur TCR, par phosphorylation de la phosphatase SHP2. Cette inhibition conduit à la suppression de la réponse des lymphocytes T, par apoptose, anergie ou épuisement (Zou et al. 2016).

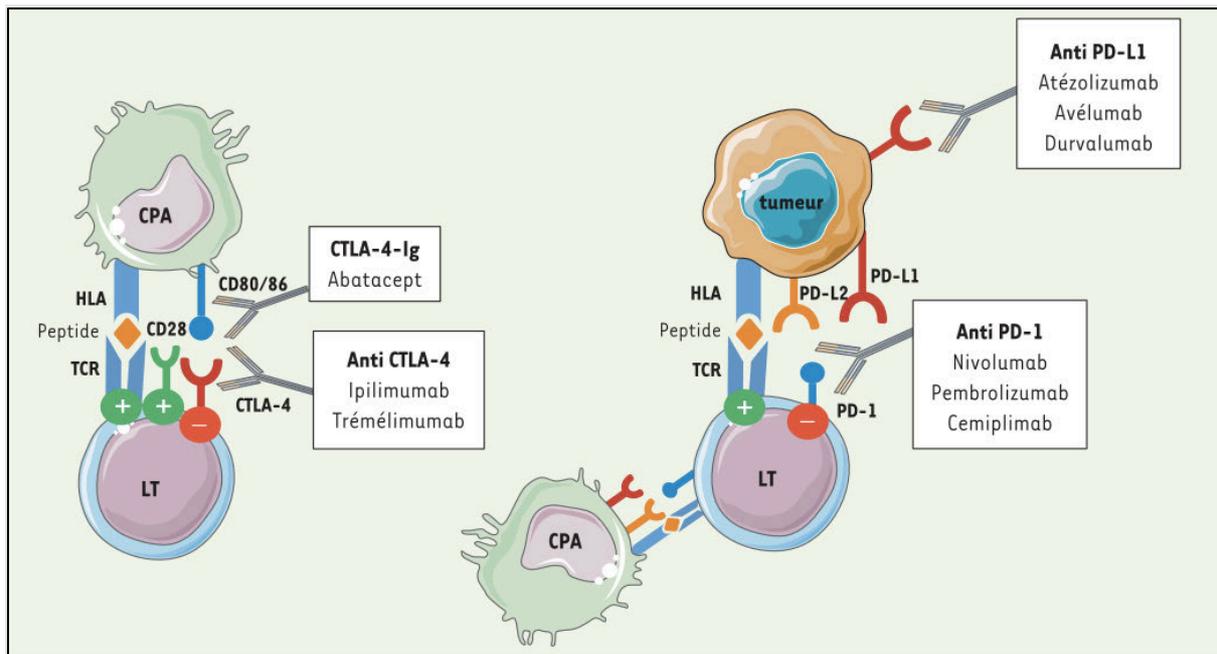


Figure 5 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux bloquant CTLA/4 et PD-1/PD-L1

CTLA-4 et PD-1 sont exprimés par des lymphocytes et modulent leur activation, mais à des niveaux différents. CTLA-4 intervient dans les organes lymphoïdes secondaires lors de l'activation des LTs naïfs et également en périphérie, tandis que PD-1 est impliqué après l'activation des LTs en périphérie et maintient l'inhibition des LTs dans le TME. L'activation par PD-L1 du récepteur PD-1 à la surface des lymphocytes T entraîne la mise en place d'un phénotype dysfonctionnel dit « épuisé » (exhausted en anglais), correspondant à des lymphocytes dont la prolifération et les fonctions effectrices sont inhibées (Borst et al. 2021). L'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 par un anticorps bloquant l'un ou l'autre des partenaires moléculaires restaure les fonctions des lymphocytes.

Le premier anticorps bloquant un PCI est l'ipilimumab, un IgG1 anti-CTLA-4 approuvé en 2011 par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, pour le traitement des mélanomes. L'analyse de tous les essais cliniques a montré une réponse durable au traitement, avec un taux de survie stable de 3 ans à 10 ans après le traitement pour 21% des patients (Sharma et al. 2017). Le premier anticorps ciblant PD-1, le nivolumab, a été approuvé par la FDA en 2014, et dans les quatre ans qui ont suivi, cinq autres anticorps ciblant l'axe PD1/PD-L1 ont été mis sur le marché. Ces anticorps sont prescrits, seuls ou en combinaison avec une chimiothérapie ou un anti-CTLA-4, dans les indications suivantes : cancer métastatique du poumon à petite cellules (SCLC) et non à petites cellules (NSCLC), Lymphome de Hodgkin, Cancer du sein triple

négatif (TNBC), mélanome métastatique, carcinome à cellules de Merkel, cancer de la peau à cellules squameuse (cSCC), cancer du rein (RCC), cancer de l'œsophage et cancer du col de l'utérus (Munari et al. 2021). Il faut remarquer que ces thérapies représentent pour ces cancers la première ou la deuxième ligne de traitement, indiquant leur efficacité supérieure comparée aux traitements de référence.

Les effets secondaires majoritairement observés lors des traitements par anticorps anti-PCI sont liées aux réactions du système immunitaire. Ce sont des atteintes dermatologiques et digestives dans 40% et 30% des cas respectivement. Il s'agit de réactions de type rash, érythèmes ou vitiligo, et des colites inflammatoires. Ces dernières sont particulièrement surveillées, car elles risquent d'entraîner des perforations intestinales et donc de compromettre le pronostic vital du patient (Dubois et al. 2019). La période médiane d'apparition des effets secondaires se situe autour de 8 semaines après le début du traitement. Selon le grade de sévérité des effets secondaires, classés sur une échelle de 1 à 4, les organismes de santé recommandent des protocoles précis. Pour le grade 1, le traitement est maintenu et les symptômes des effets secondaires sont désormais connus, pris en charge et soignés. A partir du grade 2, le traitement initial est suspendu afin de traiter les effets secondaires par corticothérapie ou immunosuppresseurs jusqu'à les ramener au grade 1, par exemple en administrant des AcM ciblant le TNF α ou l'IL-17. Au stade 4, il est recommandé d'interrompre définitivement l'immunothérapie.

Bien que l'utilisation des immunothérapies PD1 et CTLA-4 ait été une révolution dans l'immunothérapie, certaines problématiques restreignent leur application, et pour le cas des thérapies PD1/PD-L1 le taux de réponse clinique se réduit à seulement 40% (Wu and Dai, 2017). Premièrement, l'inclusion des patients requière la validation d'un certain nombre de biomarqueurs prédictifs d'une bonne réponse aux traitements, comme l'expression de PD-L1 détectée par immunohistochimie, la charge de mutation tumorale (mutational burden, en anglais) ou le taux de LT CD8 infiltrées, qui sont corrélées à de bonnes réponses cliniques aux thérapies PD-1/PD-L1 (Marin-Acevedo et al. 2018). Cependant, la fiabilité de la prédiction de ces biomarqueurs est sujette à discussion, car il existe des variabilités selon l'anticorps utilisé ainsi que les méthodes de calcul des scores. Par exemple, selon les essais cliniques, le niveau d'expression de PD-L1 est analysé soit sur les cellules tumorales ou soit sur les cellules immunitaires infiltrant la tumeur (Munari et al. 2021).

Ensuite, comme pour les chimiothérapies, une résistance aux thérapies peut se mettre en place par les mécanismes d'immunoediting, précédemment décrits, rendant alors les monothérapies inefficaces (Sharma et al. 2017). Enfin, la bio distribution dans des tumeurs solides par les AcM conventionnels est critique, les anticorps qui atteignent les régions centrales de la tumeur ne représentent qu'une faible partie de la quantité des anticorps injectés par voie intraveineuse.

c. Les cellules immunosuppressives dans le TME

Les premières immunothérapies ont consisté à restaurer ou induire la fonction antitumorale des effecteurs immunitaires tels que les cellules T. Toutefois, le rôle du compartiment myéloïde dans la mise en place et le maintien, ou au contraire, dans la suppression de la réponse immunitaire pro-tumorale a été démontré plus tardivement (Figure 6, adaptée de Wang et al. 2022). La population des cellules myéloïdes suppressives, Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) en anglais, est un groupe hétérogène composé de cellules myéloïdes progénitrices, de macrophages, de granulocytes et DCs immatures. Elles sont recrutées dans le TME par les nombreux signaux inflammatoires et on les retrouve dans de nombreux types de cancers humains ainsi que dans des modèles murins (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009). Il n'existe pas réellement de caractéristique principale pour ce groupe hétérogène à part leurs fonctions suppressives. En effet, Bronte et al. ont montré qu'elles participent à l'inhibition des cellules T CD8 par la sécrétion de iNOS2 et d'arginase-1 (Bronte et al. 2003). Il a été reporté que les TAMs peuvent également se différencier à partir de cette sous population (Kusmartsev et al. 2004) (Kusmartsev et al. 2005). De nombreuses stratégies thérapeutiques ciblant cette population cellulaire, dans le but de la supprimer ou d'inverser leurs fonctions immunosuppressives sont à l'étude (Li et al. 2021).

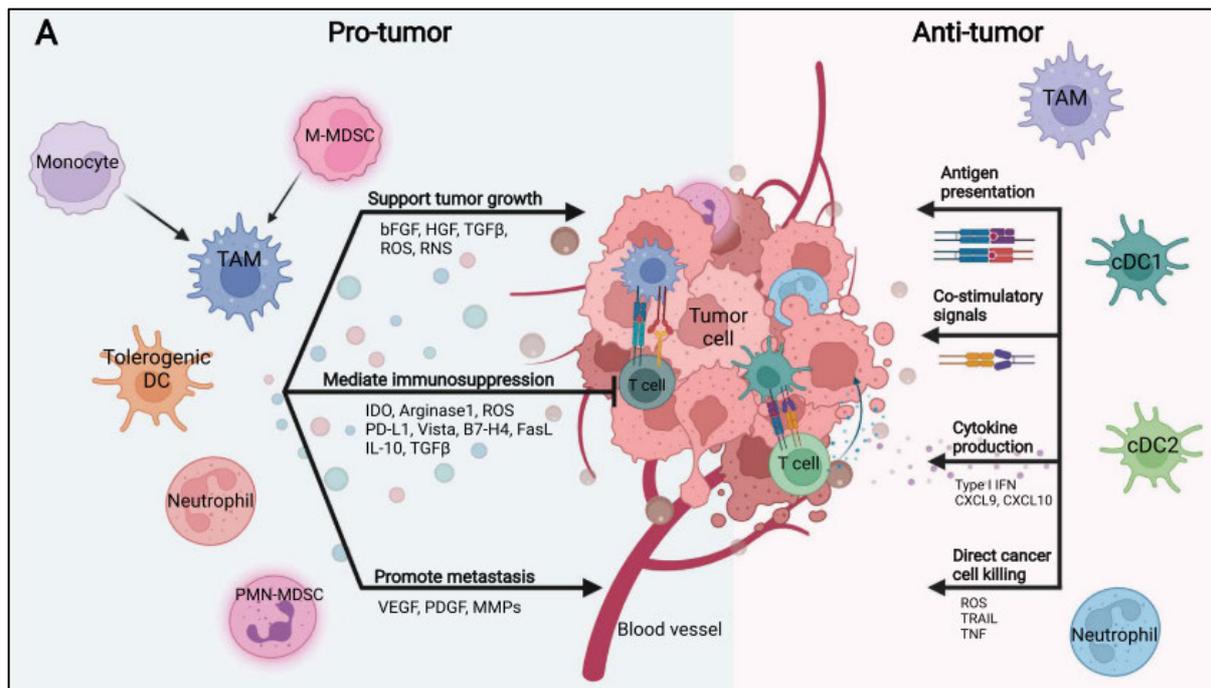


Figure 6 : Représentation schématique de la polarisation des cellules myéloïdes et des conséquences pour le TME

Les macrophages sont des cellules différenciées à partir des monocytes issus de la moelle osseuse. Le rôle principal des macrophages résidant des tissus est la phagocytose, qui permet l'élimination de cellules apoptotiques et maintient ainsi l'homéostasie des tissus. Ils ont également une capacité de présentation d'antigène comme les cellules dendritiques ou les monocytes dont ils sont issus (DeNardo and Ruffell, 2019). Au cours de la réponse immunitaire classique, ces cellules du système immunitaire inné participent à l'élimination des pathogènes et de cellules anormales, directement par phagocytose et production de ROS, puis indirectement par la présentation d'antigène des cellules phagocytées via les CMH II et l'activation des lymphocytes. Les macrophages sont communément divisés en deux sous-populations, les macrophages de type 1 (M1) ayant des fonctions antitumorales, tandis que les macrophages de type 2 (M2) ont un phénotype toléroène, bien qu'il existe une grande hétérogénéité de phénotype au sein de ces deux populations (Vitale et al. 2019).

De manière générale, les macrophages se différencient en phénotype M1 dans le cas d'infections et d'environnement pro-inflammatoire, par le biais des cytokines comme l'INF γ , TNF α et GM-CSF et la présence de motifs moléculaires associés aux pathogènes comme les lipopolysaccharides (LPS). Ils participent alors à la mise en place de la réponse immunitaire, par plusieurs mécanismes. Premièrement, en sécrétant à leur tour des cytokines pro-

inflammatoires telles que le TNF α . Ils expriment également de hauts niveaux d'oxyde nitrique synthase (iNOS), entraînant la production d'oxyde nitrique ayant des effets cytotoxiques et pro-apoptotiques (Vanini et al. 2015). Enfin, ils expriment fortement les CMH II ainsi que des molécules de costimulation, nécessaires pour exercer la fonction de cellule présentatrice d'antigène, et enfin activer le système immunitaire adaptatif : les lymphocytes T et les cellules NK.

De ce fait, les macrophages sont à la croisée du système immunitaire inné et adaptatif et régulent la réponse immunitaire globale. Les macrophages constituent la majorité des cellules immunitaires infiltrants les tumeurs solides. Présentant un phénotype M1 pro-inflammatoire, défini par l'expression des marqueurs CD80, CD86 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, et la chimiokine CXCL10 impliquée dans le recrutement de lymphocytes de type Th1, ils participent à l'immunité antitumorale (Pittet et al, 2022). Cependant, certains facteurs du TME, tels que l'hypoxie, les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF β induisent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, impliqué dans la réparation et le remodelage des tissus, notamment par la sécrétion de métalloprotéases et la prolifération des lymphocytes de Type Th2 (Vitale et al. 2019). Ces macrophages inhibiteurs de la réponse immunitaire sont désignés sous le nom de TAMs pour "Tumor Associated Macrophages" en anglais, dont la présence est corrélée à un mauvais pronostic. Ils sont caractérisés par l'expression d'arginase-1, IL-10, et les marqueurs de surface CD163, CD204 et CD206 (Duan and Luo, 2021).

Les M2 participent au développement tumoral par plusieurs mécanismes (Figure 7, adaptée de Wu et al. 2020). Tout d'abord, ils sont impliqués dans la suppression de la réponse immunitaire antitumorale. L'activité de l'arginase-1 déplete l'environnement en acide aminé L-arginine, dont la présence est indispensable au fonctionnement des cellules T (Geiger et al. 2016). En effet, l'absence de L-arginine empêche l'expression de la chaîne CD3 ϵ du TCR par les cellules T après stimulation, bloquant leur activation. Geiger et al. ont démontré ce mécanisme d'inhibition *in vivo* chez des souris par la réduction de la croissance tumorale par l'inhibition de cette enzyme. La population de lymphocytes T CD4 tolérogènes résultante maintient ensuite les macrophages dans un état immature par la production de cytokines de type Th2, notamment l'IL-4 (DeNardo and Ruffell, 2019). L'expression de différents PCI par les TAMs entraîne également l'inhibition directe des lymphocytes T. La production d'INF γ par les cellules effectrices entraîne l'expression de PD-L1 à la surface de TAM de cellules endothéliales et des

cellules tumorales (Lane et al. 2018). La surexpression de PD-L1 a été rapportée sur les populations de macrophages dans des carcinomes hépatiques, des mélanomes et des cancers ovariens (Kuang et al. 2009) et une corrélation a été établie entre l'expression de PD-L1 par ces macrophages et le taux de réponse à une thérapie bloquant PD-1 à la surface des lymphocytes T.

Les macrophages modulent également le microenvironnement tumoral. Par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, majoritairement IL-10 et TGF- β , elles participent à la prolifération des cellules du stroma tumoral et la génération de lymphocytes T régulateurs (Duan and Luo, 2021). Sous l'influence de l'environnement hypoxique, les TAMs participent à la vascularisation de la tumeur par l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF-A) (Wu et al. 2020).

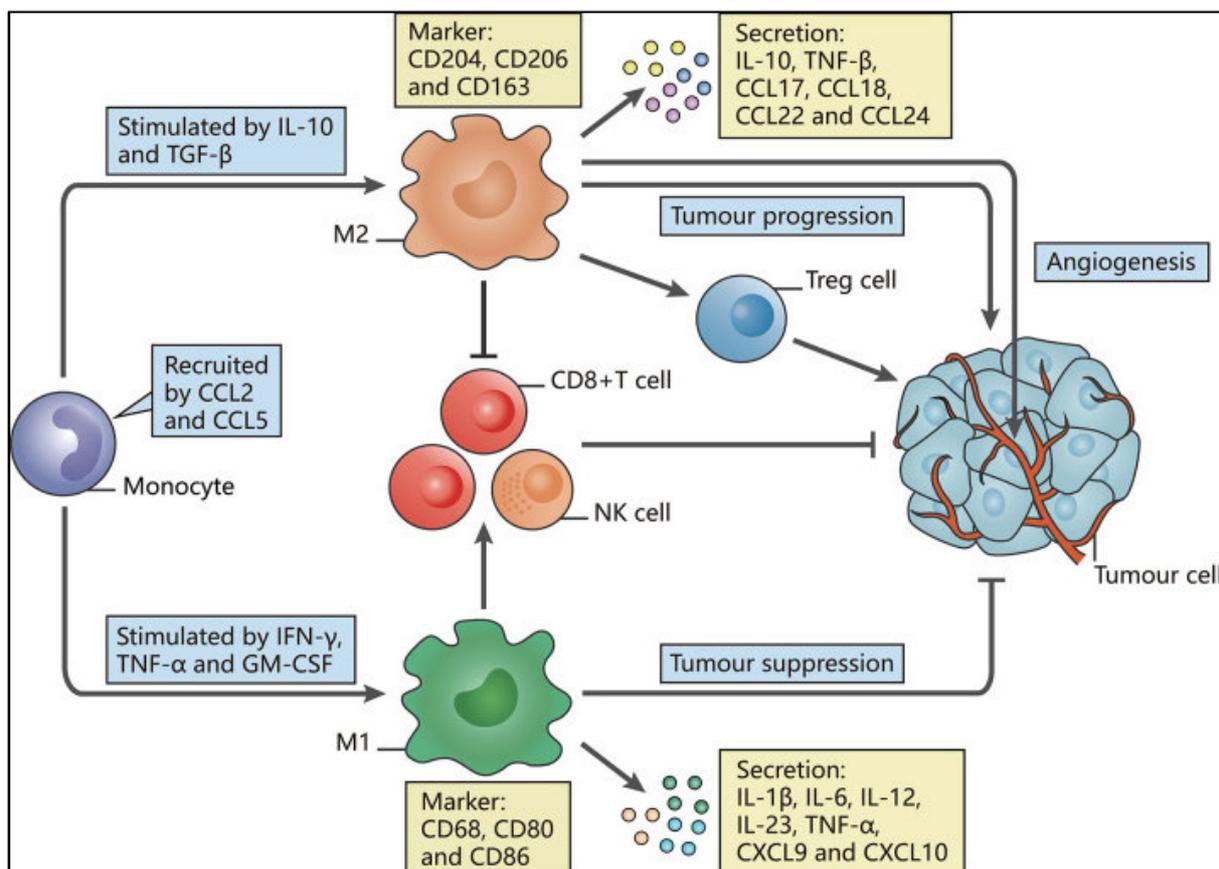


Figure 7 : Polarisation et rôle des macrophages dans le microenvironnement tumoral

Au vu de ces nombreuses preuves du rôle clé des macrophages dans la mise en place et le maintien du TME, il apparaît que la population cellulaire de TAM est une cible pertinente en

immunothérapie des cancers (Noy and Pollard, 2014). Récemment, de nouveaux PCI ont été identifiés exprimés par les TAM entraînant la génération d'une nouvelle famille d'anticorps bloquants ces nouveaux points de contrôles exprimés par les macrophages et nous en présenterons certains par la suite.

Les cellules dendritiques (DCs) ont pour rôle majeur de présenter des antigènes, exogènes et endogènes, aux cellules T via le complexe CMH/TCR et ainsi activer les T spécifiques pour recruter et monter une réponse immunitaire adaptative. Ces cellules sont présentes de façon ubiquitaire dans les tissus. Elles sont activées par la rencontre avec des motifs moléculaires associés aux pathogènes, la dégradation de l'ADN, et par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12 ou TNF α (Gardner and Ruffell, 2016). Une fois activées, les DCs migrent dans les organes lymphoïdes secondaires où elles activent les lymphocytes T par la présentation de peptides antigéniques sur les CMH (Gardner et al. 2020). On distingue communément deux populations de cellules dendritiques conventionnelles, de type 1 (cDC1) et de type 2 (cDC2). La première population est surtout caractérisée par ses fonctions de cross-présentation des antigènes exogènes et l'activation des cellules T CD8 (Gardner and Ruffell, 2016) (Veglia and Gabrilovich, 2017). L'absence de cellules cDC1 dans les tumeurs empêche la mise en place d'une réponse des cellules T CD8 (Allan et al. 2006) (Itano et al, 2003) . Les cDC2 représentent la majorité des cellules dendritiques intra-tumorales (Iwanowycz et al. 2021) et sont caractérisées par l'expression de CD11b, CDc1 et SIRPa. Elles sont impliquées dans la présentation antigénique aux cellules T CD4 via les CMH de classe II. La caractérisation précise du rôle des DCs dans le cancer est rendue difficile par les différences phénotypiques et fonctionnelles entre les deux sous populations chez la souris et l'Homme. Cependant, certains constituants du TME comme l'hypoxie, l'accumulation de lactate et la diminution du pH, la présence d'IL-10 ainsi que l'expression de PD-L1 peuvent induire la polarisation des cDCs vers des phénotypes tolérogènes aux capacités de présentations antigéniques diminuées et qui secrètent des facteurs pro-tumoraux tels que l'IL-6, IDO et TGF β (Veglia and Gabrilovich, 2017).

d. Les principaux nouveaux points de contrôle immunitaires actuellement étudiés

La famille des PCI s'est élargie depuis la découverte des axes PD-1/PD-L1 et CTLA-4/CD80, comme le montre la Figure 8 (adaptée de Marin-Acevedo et al, 2018).

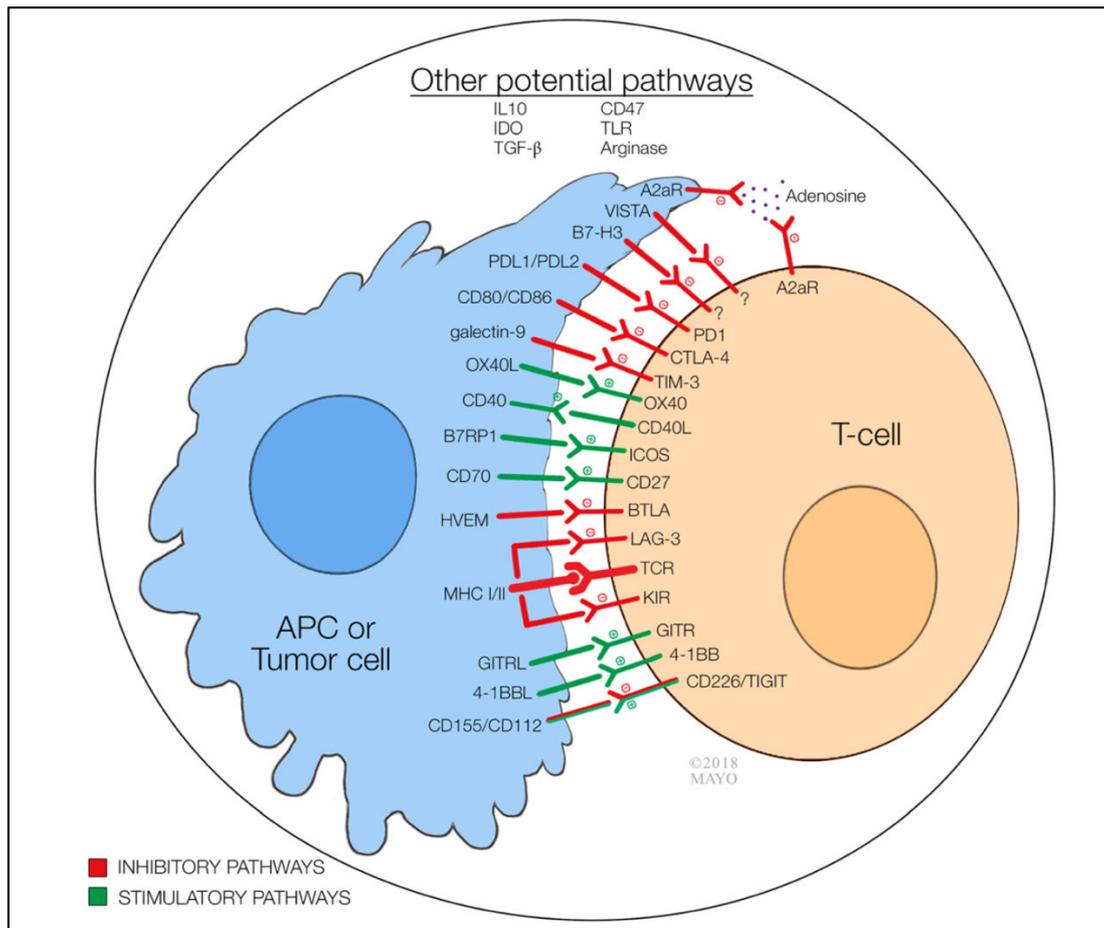


Figure 8 : De nouveaux points de contrôle immunitaires identifiés entre les CPA, les cellules T ou les cellules tumorales dans le TME

Des nouvelles cibles thérapeutiques liées aux LT ont été développées. TIM-3 est une molécule inhibitrice de la famille des récepteurs CD28-like exprimée par les lymphocytes T et les cellules dendritiques. De nombreuses études précliniques ont montré l'effet synergétique du blocage de PD-1 et TIM-3 sur l'augmentation de l'activité antitumorale des cellules T et la régression tumorale (Marin-Acevedo et al. 2021). Les premiers résultats d'études cliniques 1 ont montré une bonne tolérance de la thérapie et un bénéfice pour certains patients atteints de mélanomes, de cancer du poumon non à petites cellules et de leucémie myéloïde aigue (Ding et al. 2020). TIGIT, exprimé sur la majorité des cellules T régulatrices chez l'Homme, agit directement sur des cellules de l'immunité innée et adaptative. Par l'activation du récepteur CD155, il entraîne la polarisation des DCs vers un phénotype tolérogène qui sécrète de l'IL-10. Il diminue la prolifération et les fonctions des cellules T en empêchant la signalisation par le

TCR (Ding et al. 2020). Enfin il agit également sur les cellules NK, inhibant leurs fonctions cytotoxiques.

Lors d'un essai clinique de phase I, chez des patients atteints du NSCLC, la thérapie combinatoire anti-TIGIT et anti-PD-L1 a doublé le taux de réponse globale, passant de 16% en monothérapie anti-PD-L1 à 31% (Rodriguez-Abreu et al. 2020).

LAG-3 est considéré comme un marqueur d'épuisement des lymphocytes T. Exprimé à la surface des lymphocytes T et des cellules NK, ces cellules sont inhibées lors de son interaction avec ses ligands : les CMH II et la Galectin-3 (Chocarro et al. 2022). Le blocage concomitant de PD-1 et LAG-3 augmente l'activité antitumorale des LT. Chocarro et al. rapporte que seize thérapies basées sur des AcM antagonistes de LAG-3, en combinaison avec un AcM anti-PD-1, ont montré en essais cliniques de phases I et II, des résultats prometteurs en termes de sûreté, de tolérance et d'effets antitumoraux.

Les premières immunothérapies ont consisté à agir directement sur les cellules effectrices notamment les lymphocytes T, afin de restaurer leurs fonctions cytotoxiques. Cependant la mise en évidence ces dernières années du rôle clé du compartiment myéloïde, sorte de chef d'orchestre de la réponse immunitaire dans le TME, a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires et réorienté les stratégies thérapeutiques vers la reprogrammation de ces cellules immunosuppressives.

De nouveaux axes thérapeutiques pour cibler les cellules myéloïdes immunosuppressives

Le compartiment myéloïde peut être ciblé par différents axes, comme le recrutement des cellules dans le TME, leur prolifération et leurs fonctions immunitaires (Wang et al. 2022). Plusieurs PCI associés aux cellules myéloïdes ont été identifiés et sont étudiés actuellement. Par exemple, la molécule CD47 est un marqueur du soi exprimé de façon ubiquitaire, qui empêche la phagocytose en se liant au récepteur SIRP α des macrophages. Certaines tumeurs solides et hématologiques expriment CD47 et échappent ainsi à la destruction par le système immunitaire (Mantovani et al. 2022). Cet axe d'échappement au système immunitaire est ciblé par des AcM antagonistes de CD47, qui restaurent l'activité de phagocytose des macrophages et leur sécrétion de cytokines (Sokolosky et al. 2016). Cependant cette thérapie présente un grand risque de toxicité immunitaire qu'on appelle « on target off tumor », qui représente une

des limitations principales des immunothérapies, due à l'expression ubiquitaire de CD47 (Marin-Acevedo et al. 2018).

MARCO est un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires, exprimé constitutivement par les macrophages de type M2 et identifié dans les cancers du pancréas, de la peau, du cervix, des testicules, de la thyroïde, des reins et du système nerveux central (Wang et al. 2022). Dans des modèles de mélanome, de cancers du sein et de CRC, l'injection d'un antagoniste de MARCO réduit le volume tumoral et inverse le phénotype des macrophages M2 vers un phénotype M1, aboutissant à une diminution du niveau de T régulateur infiltrés (Georgoudaki et al. 2016).

Une autre cible de l'immunothérapie dirigée contre les cellules myéloïdes suppressives est le ligand orphelin B7-H4, exprimé par les macrophages CD14+, capable d'inhiber la production d'IL-2 par les lymphocytes T et leur prolifération. Cependant, la pertinence de cibler B7-H4 en immunothérapie est sujet à discussion, car des résultats contradictoires sur les effets biologiques ont été rapportés, qui semblent différer selon le type de modèle tumoral étudié (DeNardo and Ruffell, 2019).

Bloquer les voies de signalisations de cytokines pro-tumorales comme l'IL-10, est également un axe étudié en immunothérapies. Cette cytokine anti inflammatoire est sécrétée par les MDSCs (Hart et al. 2011) différentes populations de macrophages et DCs tolérogènes. Elle joue aussi un rôle important dans le TIME, incluant l'augmentation de l'activité des T régulateurs et l'inhibition de l'IL-12 par les lymphocytes T auxiliaires (Oft, 2014). L'IL-10 semble cependant avoir des propriétés anti-tumorales, comme observé chez des souris déficientes pour le récepteur IL-10R qui sont plus prompt à développer des cancers du côlon et des lymphomes à cellules B (Bén et al. 2013) (Berg et al. 1996).

Cependant, l'intérêt de neutraliser cette cytokine en immunothérapie a été démontré. En association avec un anticorps anti-PD-1 dans un modèle murin de cancer ovarien, le blocage de cette voie de signalisation augmente le taux de survie, entraîne un retard de croissance tumoral, ainsi qu'une augmentation de la proportion de lymphocytes T infiltrés et une diminution des MDSCs (Mabuchi, et al, 2021).

Les réponses immunitaires étant régulées par des signaux inhibiteurs ainsi que des signaux activateurs, de nombreuses études visent à activer certaines de ces molécules de costimulation

pour promouvoir la réponse immunitaire. Cette approche repose sur la génération d'anticorps agonistes, capables d'activer la voie de signalisation par fixation au récepteur. Ce mécanisme d'action dépend de l'affinité de l'anticorps pour sa cible, de l'épitope ciblée, de la valence et de la capacité de l'anticorps à générer des clusters à la surface cellulaire (Garber, 2020). Certains groupes ont développé des IgG agonistes de plusieurs molécules de costimulations comme OX-40, 4-1BB ou ICOS, impliquées dans l'activation des lymphocytes T (Mayes et al., 2018). L'interaction entre le récepteur de costimulation CD40, exprimée par les CPA, et son ligand CD40L constitue le deuxième signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T après l'engagement de TCR et d'un CMH II (Elgueta et al. 2009). Dans un modèle de cancer pancréatique, il a été démontré que l'activation par un AcM agoniste de CD-40 entraîne la reprogrammation des macrophages M2, et restaure leurs fonctions de présentation d'antigènes, accompagné d'une réduction à court-terme du volume tumorale (Beatty et al. 2011). Cependant, le défi majeur des thérapies basées sur des anticorps agonistes est lié aux effets secondaires immunitaires, qui peut aboutir dans certains cas à une suractivation des LT indépendante de la reconnaissance spécifique d'un TCR et entraîner de lourds effets secondaires irréversibles. Un essai clinique en 2006 avec un AcM agoniste de la molécule CD28 a entraîné une tempête cytokinique et provoqué une insuffisance multi-organes chez six patients sains (Garber, 2020).

Malgré les premiers succès de l'immunothérapie utilisant des inhibiteurs de PCI dans le traitement des cancers, des améliorations de ces stratégies thérapeutiques restent nécessaires. En effet, une étude a estimé que seulement 13% des patients atteints de cancers aux Etats Unis répondent aux traitements par immunothérapies (Haslam and Prasad, 2019). Parmi les différents axes d'amélioration, on peut citer le développement d'anticorps ciblant de nouveaux points de contrôles immunitaires, pour les utiliser en combinaison et tenter de contourner la résistance des tumeurs aux traitements en monothérapies, mais aussi le développement de nouveaux formats d'anticorps avec de meilleures capacités de pénétration tumorale. Récemment, un récepteur inhibiteur, propre aux cellules myéloïdes, a été identifié comme un PCI pouvant avoir une action directe sur la polarisation des cellules myéloïdes suppressives dans le TME.

II. ILT4, un nouveau point de contrôle immunitaire

1) Un récepteur inhibiteur du système immunitaire

a. Structure

Les ILTs, pour Ig Like Transcript en anglais, font partie de la superfamille des Ig-like récepteurs, tout comme les Killer cell Ig-like receptors (KIR) des NK et les Fc récepteurs ainsi que leurs orthologues murins : les paired Ig-like receptors (PIRs). Ils ont été découverts en 1997 par des groupes différents (Wagtmann et al. 1997)(Colonna et al. 1997) ce qui explique leurs différentes dénominations. En effet, on les trouve désignés dans la littérature comme LILRB pour Leukocyte Ig-Like Receptor subfamily B (Figure 9A, adapté de Kang et al, 2015), ainsi que CD85. Dans ce manuscrit, nous utiliserons la dénomination ILT.

Wagtmann *et al* décrit l'existence d'un nouveau groupe de gènes exprimés par les monocytes et macrophages, codant pour des protéines structurellement similaires aux KIR, possédant un domaine extracellulaire de 4 IgG-like et une région cytoplasmique composée de motifs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, en anglais), qu'ils ont nommé MIR pour Monocyte/Macrophage Immunoglobulin-like Receptors. Dans le même temps, le groupe de Colonna *et al* décrit la présence d'un récepteur inhibiteur se liant aux CMH-I et exprimé à la surface des NK et des lymphocytes B et T, qu'ils ont nommé Ig-like transcript 2 (ILT2). Ils décrivent aussi la présence de récepteurs homologues sur les cellules de la lignée myéloïde, en accord avec les observations de Wagtmann *et al*.

Cette famille regroupe de récepteurs inhibiteurs, mais également des récepteurs activateurs, LILRA, Leukocyte Ig-Like Receptor subfamily A (Colonna et al. 2000). Ceux-ci sont composés de régions extracellulaires Ig-like, associées à des domaines intracellulaires activateurs comportant des motifs ITAM (Motif d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine). Les fonctions inhibitrices des ILT dépendent d'un équilibre entre des signaux activateurs via les récepteurs LILRA, et l'inhibition de ces voies de signalisation par l'activation des ILT (van der Touw et al. 2017) (Figure 10).

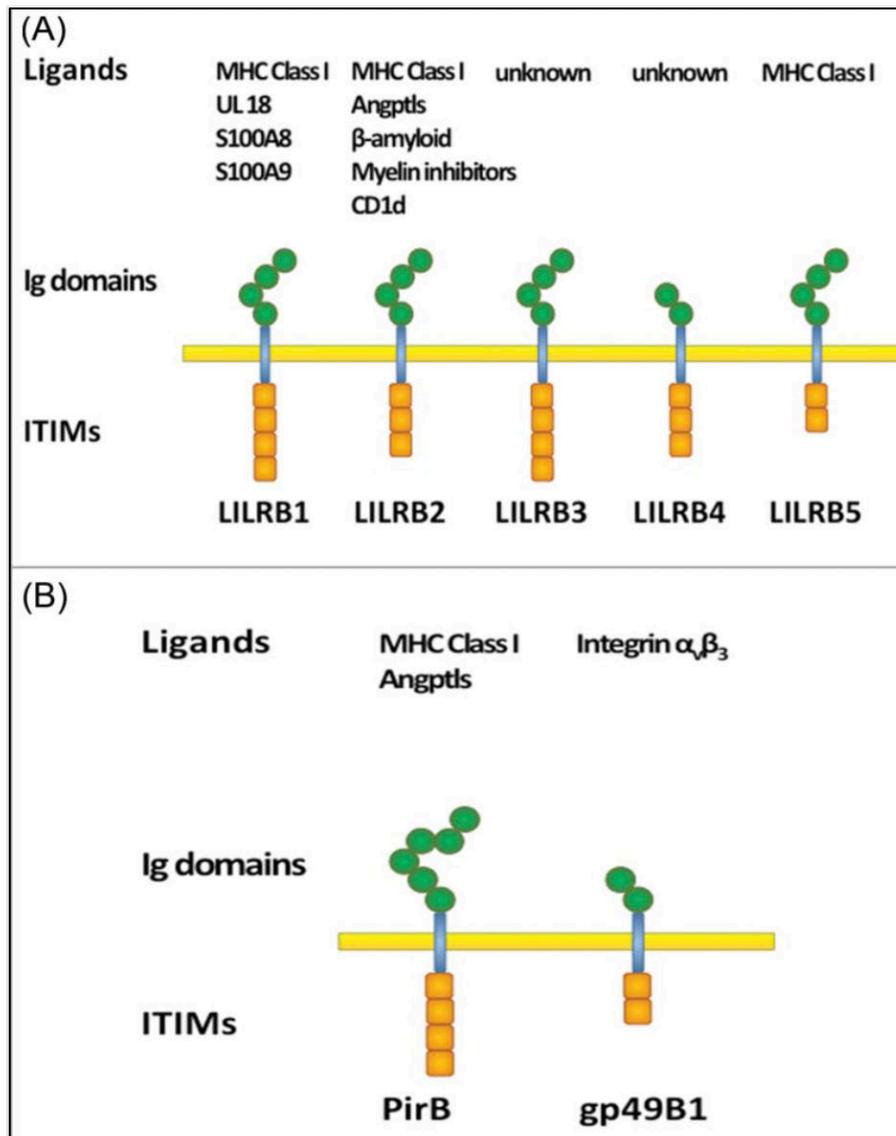


Figure 9 : La structure des récepteurs de la famille des ILTs (ou LILRBs)

- A. Structure des récepteurs humains B. Structure des récepteurs murins de la famille des ILTs

Les cinq récepteurs inhibiteurs de la famille des ILTs humaines partagent des similitudes structurelles. La séquence protéique du domaine extracellulaire a une taille d'environ 70 à 110 acides aminés et présente une structure en sandwich de deux feuillets beta antiparallèle, similaire au repliement des chaînes d'immunoglobulines (Kuroki et al. 2012). Ce domaine confère aux récepteurs leur spécificité tandis que la partie cytoplasmique porte une fonction inhibitrice composée de motifs d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITIMs). L'activation des récepteurs ILTs est médiée par la liaison du domaine extracellulaire avec les ligands, qui entraîne la phosphorylation des tyrosines des domaines ITIMs de la région intracellulaire du récepteur par la kinase Lyn (Figure 10, adapté de van der Touw et al, 2017).

Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation des phosphatases SHP1 et SHP2, entraînant la déphosphorylation de différentes molécules impliquées dans la voie de signalisation. Deux des cinq récepteurs humains ont été principalement décrits : ILT2 et ILT4, aussi appelés LILRB1 et LILRB2 respectivement (Kang et al. 2016). Leur domaine extracellulaire (ECD) est composé de quatre domaines D1, D2, D3 et D4, le domaine C-terminal D1 étant le plus éloigné de la membrane.

L'ILT4 est une protéine de 597 acides aminés, mais la forte glycosylation du domaine extracellulaire augmente son poids moléculaire apparent à environ 95kDa (base de données UniProtKB Q8N423 et données générées dans cette thèse, voir la partie Résultat annexe 3).

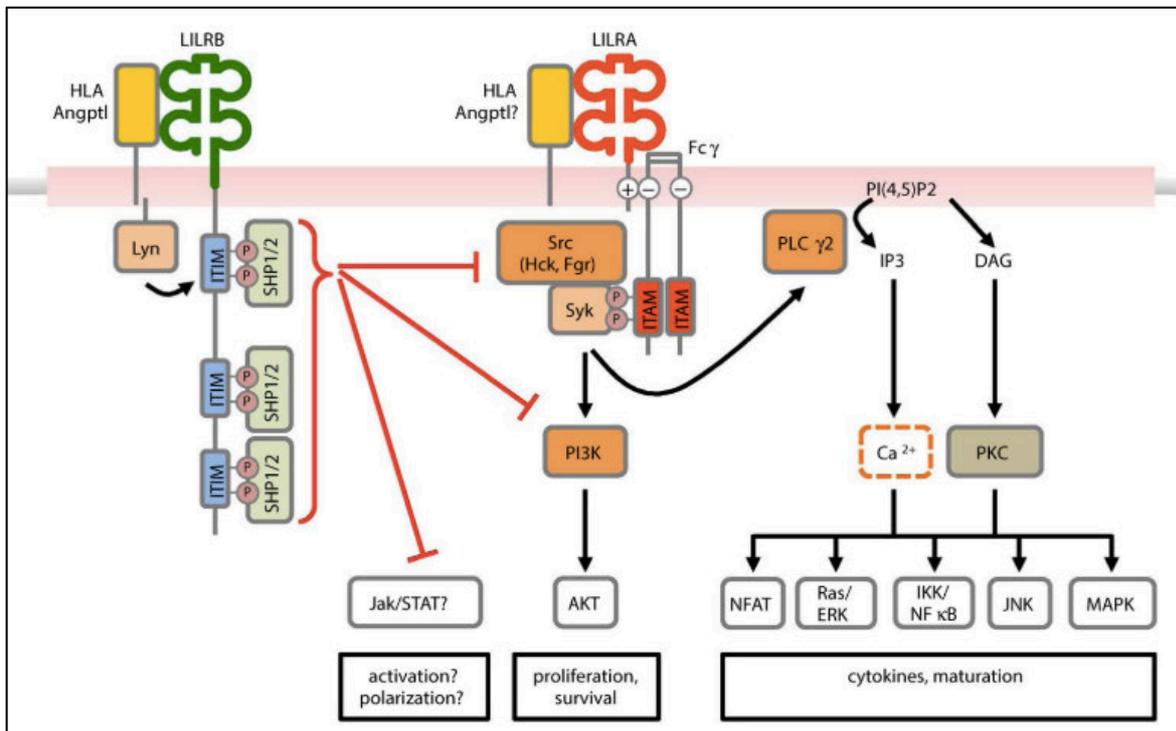


Figure 10 : La voie de signalisation des récepteurs ILT inhibiteurs (LILRB) et activateurs (LILRA)

b. Un récepteur de la tolérance périphérique

Il existe un orthologue murin des récepteurs ILTs humains, qui a permis d'explorer *in vivo* le rôle de ces récepteurs dans l'immunité et d'apporter plusieurs preuves du rôle tolérogène de ces récepteurs. Ce récepteur murin, PIR-B, est composé de 6 domaines extracellulaire IgG-like

et de 4 domaines ITIMs dans sa région intracellulaire (Figure 9B). Il a été démontré que les molécules HLA-G et ANGPTLs humaines se lient au récepteur murin et sont capables de l'activer à l'instar de l'ILT4 (Liang et al. 2002) (Zheng et al. 2012).

Des souris déficientes pour PIR-B ont permis de démontrer que ce récepteur régule négativement la réponse immunitaire. En effet, des modèles murins d'allogreffe déficients pour PIR-B présentent des réponses exacerbées de l'hôte contre le greffon, des réponses B amplifiées et un déséquilibre des réponses Th1 Th2 (Takeda and Nakamura 2017). PIR-B est également impliqué dans la maturation des DCs. Chez des souris déficientes pour PIR-B, les DCs expriment faiblement les CMH II à leur surface, empêchant l'augmentation de l'expression de molécules de costimulation suite au contact avec un antigène (Ujike et al. 2002).

ILT4 a également un rôle dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques et ostéoclastes dans un état non différencié. En effet, les ILT1 à 4 sont constitutivement activés à la surface de population de macrophages et des cellules précurseurs des ostéoclastes. La délétion de PIR-B chez des souris accélère la différenciation des cellules souches en ostéoclastes (Mori et al. 2008). Des données *in vitro* d'activation d'ILT4 ou PIR-B par leurs ligands, associées à l'étude de PIR-B dans des modèles murins, ont permis d'établir la preuve du rôle immunosuppresseur de ce récepteur dans le système immunitaire, ainsi que son implication dans différentes pathologies.

c. Les ligands d'ILT4

Les molécules du CMH I, dont HLA-G

Tout comme les récepteurs KIR, dont le rôle est de réguler négativement les cellules NK face aux cellules du soi, les récepteurs ILTs reconnaissent les molécules du CMH de classe I. Une étude suggère que les récepteurs ILT2 entrent en compétition avec la molécule CD8 à la surface des lymphocytes T pour l'association aux CMH I, régulant ainsi négativement l'activation de ces cellules (Shiroishi et al. 2003).

Si l'affinité d'ILT4 et ILT2 pour les CMH I est faible et varie entre 2 à 45 μ M, il est intéressant de noter que l'affinité pour HLA-G est trois à quatre fois supérieure par rapport aux autres CMH I, en faisant ainsi un des ligands principaux pour ces deux récepteurs (Shiroishi, Kuroki, Ose, et al. 2006; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al. 2006). La protéine HLA-G sera présentée par la suite dans la partie dédiée au rôle de l'axe HLA-G/ILT4 dans le développement cancéreux.

L'activation des ILTs en *cis* par interaction avec des CMH I exprimés à la surface des cellules a été mise en évidence par des expériences de transfert d'énergie (FRET) par Mori *et al.* en 2008 à la surface de précurseurs d'ostéoclastes. Cette activation en *cis* explique la phosphorylation constitutive des ILTs et de PIR-B, jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie. En effet, la perte d'expression des CMH I ou des ILTs à la surface des mastocytes les rend plus susceptibles à l'activation par des IgE ou du LPS (Masuda *et al.* 2007). L'analyse structurale d'ILT4 par cristallographie appuie cette hypothèse d'activation en *cis* (Q. Wang *et al.* 2019).

Les protéines Angiopoïétine-like (ANGPTLs)

Les ANGPTL2 sont des protéines sécrétées, apparentées aux angiopoïétines par leur structure similaire et leurs fonctions dans la régulation de l'angiogenèse. Plus particulièrement, L'ANGPTL2 joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, par la régulation de l'inflammation et du métabolisme des lipides entre autres. Son interaction avec l'ILT4 et son implication dans le développement tumoral feront également l'objet d'une partie de l'introduction cette thèse.

La β -Amyloïde

La présence d'ILT4 à la surface des neurones a été, de façon assez surprenante, observée en 2008 (Atwal *et al.* 2008). Il s'agit de la première observation de l'expression d'ILT4 en dehors du territoire hématopoïétique, et laisse penser que ce récepteur a des fonctions non-immunologiques. Et en effet, il a été montré qu'ILT4, par sa liaison aux formes oligomériques de la β -amyloïde, module la plasticité synaptique (Kim *et al.* 2013). La maladie d'Alzheimer se caractérise par la perte de plasticité neuronale due notamment à l'accumulation d'oligomères de β -amyloïdes sous forme de plaques dans le cerveau, aboutissant à des pertes de la mémoire. L'équipe de Kim *et al.* a pu clairement relier l'interaction entre le récepteur PIR-B et les plaques β -amyloïde à la perte de plasticité neuronale dans un modèle AD de souris. Ils ont également démontré que l'ILT4 est un récepteur pour les oligomères de β -amyloïde, avec une affinité de l'ordre de 180 nM. Ces données suggèrent, donc, un rôle de l'ILT4 dans le développement de la maladie d'Alzheimer. En 2018, une équipe a confirmé ce résultat et a localisé le site d'interaction entre la β -amyloïde et ILT4 au niveau des domaines D1-D2 (Cao *et al.* 2018). Les

auteurs ont identifié un composé chimique capable d'inhiber l'interaction entre ILT4 et β -amyloïde, ouvrant une piste de thérapie pour cette pathologie.

d. Régulation de l'expression d'ILT4

Une étude portant sur les éléments de régulation de la transcription d'ILT4 a montré que sa transcription est induite par le facteur Sp1 spécifique des régions riches en GC conservées dans les régions promotrices de nombreux gènes (Nakajima et al. 2003). Des modifications épigénétiques comme l'acétylation des histones dans la région du promoteur restreignent l'expression d'ILT4 aux cellules de la lignée myéloïde. L'expression d'ILT4 à la surface de ces cellules augmente au cours de leur maturation. Il a été montré que des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 entraîne l'augmentation de l'expression de l'ILT4 à la surface (Guerra-De Blas et al. 2016)(Chang et al. 2002).

e. Expression d'ILT4 dans le cancer

Nous avons vu précédemment que l'expression et donc les fonctions physiologiques d'ILT4 sont fortement restreintes à certains compartiments cellulaires, majoritairement aux cellules myéloïdes, les cellules souches hématopoïétiques, et aux neurones. Cependant de nombreuses études récentes ont révélé une expression ectopique de l'ILT4 à la surface de cellules tumorales (Gao et al, Zheng et al, Sun et al, 2016,).

Plusieurs études immunohistochimiques rapportent l'expression d'ILT4 dans les tissus cancéreux, expression inexistante dans les tissus sains adjacents. C'est le cas chez des patients atteints de cancers du poumons, NSCLC ou adénocarcinomes, ainsi que des cancers du sein, de l'œsophage, du pancréas, de l'endomètre et des carcinomes hépatiques. De plus, cette expression est corrélée négativement avec la survie des patients dans les NSCLC et le cancer du sein (Gao et al. 2018) (Chen et al. 2021) (Shao et al. 2018) (Li et al. 2020) (Yang et al. 2021). La forte expression d'ILT4 dans le cancer colorectal, évaluée par marquage immunohistochimique (IHC) sur des coupes de tumeurs de patients, est corrélée avec une diminution de la proportion de cellules T CD8 dans l'infiltrat tumoral, et l'augmentation de la population de lymphocytes T régulateurs FOXP3+ (Yang et al. 2021). Elle est également

associée à un mauvais pronostic de survie par rapport à des patients dont les tumeurs expriment faiblement ou pas ILT4.

Une étude sur l'expression d'ILT4 dans des cancers de l'endomètre a permis d'établir un lien entre son expression et la progression tumorale (Shao et al. 2018). L'analyse immunohistochimique de tumeurs de patientes a montré que l'expression d'ILT4 était corrélée à un mauvais pronostic de survie. *In vitro*, ILT4 promeut la prolifération de lignées cellulaires du cancer de l'endomètre, par l'activation de la voie de signalisation SHP2/CaMK1/CREB. En effet, les cellules dont l'expression d'ILT4 a été inhibée par transduction avec des ARN interférants, prolifèrent plus lentement que les cellules non traitées. Dans ce modèle, le rôle d'ILT4 semble lié à son activation constitutive, cependant les auteurs ne donnent pas d'hypothèse sur les ligands potentiellement responsables de cette activation.

Les conséquences de la présence d'ILT4 sur la fonction des LT CD4 et CD8 a été étudiée (Gao et al. 2021). Les auteurs montrent que la coculture de LT avec des lignées de cellules tumorales exprimant ILT4 entraîne l'induction d'une population de cellules T sénescentes, caractérisée par une augmentation de l'activité de la β -galactosidase et par la diminution de molécules de costimulation telles que CD27 et CD28. Dans ce modèle, le blocage d'HLA-G ou d'ILT4 par un anticorps antagoniste diminue l'activité de la β -galactosidase par les LT CD4 les auteurs émettent donc l'hypothèse que cette induction passe par l'activation d'ILT4 par HLA-G, exprimé à la surface des cellules T.

Des études *in vitro* et *in vivo* chez la souris ont montré que l'expression d'ILT4 dans des cellules de NSCLC active l'expression de VEGF-C et promeut la progression tumorale (Zhang, Guo, et al. 2015). Une corrélation a été établie entre la co-expression d'ILT4 et de VEGF-C et un mauvais pronostic chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules.

Des preuves cliniques de l'implication d'ILT4 dans le développement tumoral ont été établies, cependant les mécanismes moléculaires par lesquels ILT4 entraîne la mise en place du microenvironnement immunosuppresseur ou la prolifération des cellules tumorales ne sont pas toujours clairement établis. Dans la partie suivante, nous étudierons l'interaction entre ILT4 avec deux de ses ligands majoritaires, HLA-G et l'ANGPTL2.

2) ILT4, un point de contrôle immunitaire (axe HLA-G/ILT4)

a. HLA-G, une molécule inhibitrice

HLA-G est une molécule du CMH I dite non classique, car elle n'a pas de rôle de présentation de peptide du soi comme les CMH I classiques et elle présente un polymorphisme très restreint. Cette protéine a été identifiée et décrite pour la première fois comme un agent tolérogène à l'interface fœto-maternel (Goldman-Wohl et al. 2000) (Kovats et al. 1990). Exprimée par les cytotrophoblastes extra villoeux sur les cellules du placenta à l'interface entre le fœtus et la mère, elle inhibe les cellules NK maternelles par l'interaction avec le récepteur KIR2DL4. En contexte non-pathologique, le territoire d'expression d'HLA-G est majoritairement restreint au placenta, au thymus et à des sites immuno-privilegiés comme la cornée (Lin and Yan 2015).

Malgré son polymorphisme limité, HLA-G est une protéine complexe car plusieurs isoformes, solubles et membranaires, sont générées par l'épissage alternatif d'un unique transcrite primaire. Le seul point commun entre ces différentes isoformes est la présence conservée du domaine N-terminal alpha 1 (Figure 11, adapté de Carosella et al. 2015). Deux isoformes, HLA-G1 membranaire et HLA-G5 son équivalent soluble, présentent la forme canonique des molécules du CMH I composée de trois domaines globulaires alpha1, alpha2 et alpha3 associés de façon non covalente à la bêta-2-microglobuline (β 2m). La liaison de la chaîne lourde avec la β 2m nécessite la présence des trois domaines, toutes les autres isoformes sont donc non-associées à la β 2m. Les différentes isoformes, avec ou sans β 2m, présentent des spécificités et affinités différentes pour les récepteurs ILT4 et ILT2 (Carosella et al. 2015). En effet, ce dernier récepteur ne reconnaît que les formes liées à la β 2m, tandis que le récepteur ILT4 est capable de se lier à toutes les isoformes possédant un domaine alpha3, associées ou non à la β 2m.

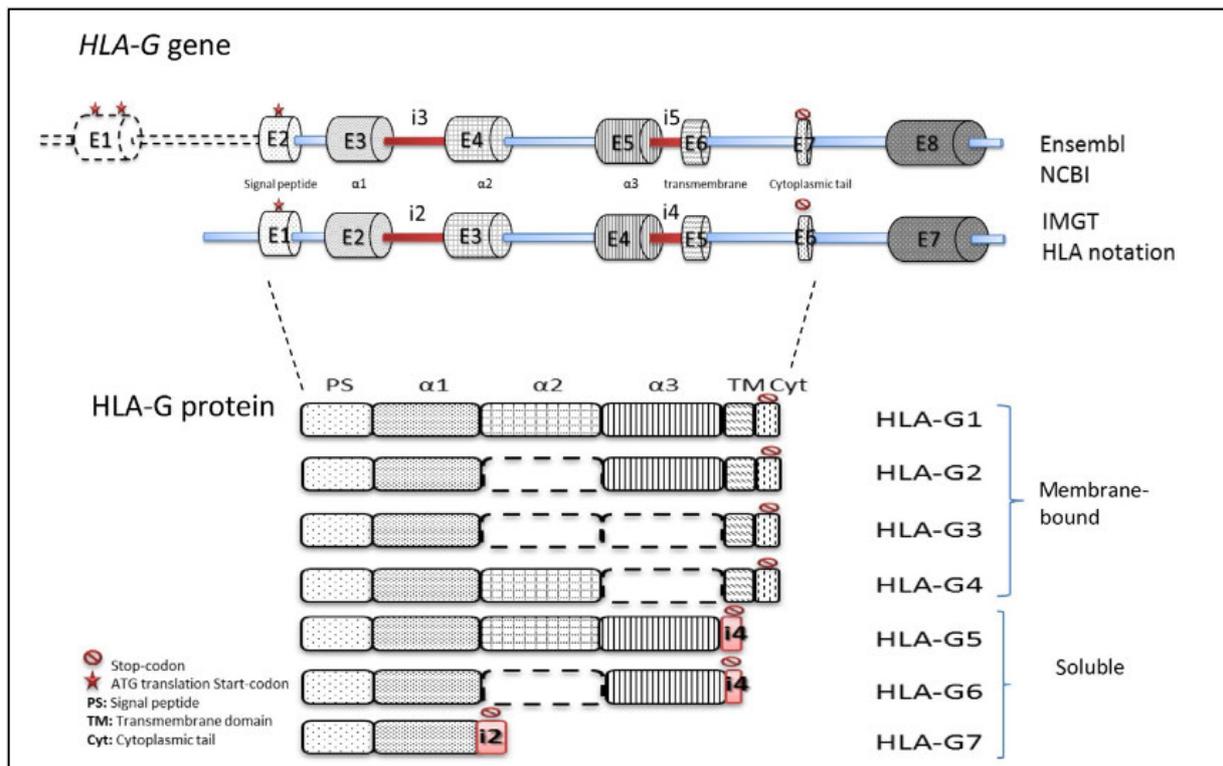


Figure 11 : Structure génétique et protéique des différentes isoformes de HLA-G

Ainsi, les différentes isoformes de HLA-G ne ciblent pas les mêmes sous populations du système immunitaire. Cette préférence d'association laisse penser que toutes les isoformes ne sont pas simplement des redondances, mais qu'elles jouent un rôle spécifique selon le territoire et le moment de leur synthèse.

L'affinité augmentée d'HLA-G pour les récepteurs ILTs par rapport aux molécules du CMH I classique réside dans deux variations dans la séquence du domaine alpha3 : les acides aminés H195 et S197 de la boucle HDS des CMHI, sont substituées par les acides aminés F195 et Y197, formant une boucle hydrophobe qui participe à l'interaction avec les ILTs (Shiroishi et al. 2003) (Shiroishi et al. 2006) (Clements et al. 2005).

Des études structurales par analyse cristallographique ont permis de déterminer les sites d'interaction entre HLA-G et les récepteurs ILT4 et ILT2 (Shiroishi et al. 2006) (Kuroki et al. 2019) (Q. Wang et al. 2019). Pour les deux récepteurs, le site d'interaction se situe au niveau des domaines D1 et D2, qui interagissent avec le domaine alpha3 de HLA-G. Tandis qu'ILT2 reconnaît principalement la β2m et ensuite le domaine alpha3, la surface de contact entre ILT4 et le domaine alpha3 est supérieure et indépendante de la β2m. Ceci explique donc, la capacité de l'ILT4 à reconnaître les formes de HLA-G non associées à la β2m.

b. Mécanismes et conséquences de l'inhibition par HLA-G d'ILT4 sur les myéloïdes

De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'effet tolérogène de l'axe HLA-G/ILT4 sur différentes populations myéloïdes. D'après les résultats de plusieurs études cliniques sur l'expression de HLA-G, il semble qu'elle apparaisse aux stades avancés de la tumorigenèse et participe à la mise en place et au maintien du TME. Ceci peut s'expliquer par le fait que son expression est induite par des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et TFG- β ainsi que dans des conditions hypoxiques (Amiot et al. 2011). Par son interaction avec ILT2 et ILT4, HLA-G participe dans le TME à la mise en place du compartiment myéloïde immunosuppresseur, par l'inhibition de la maturation et de la différenciation des DCs, la polarisation de macrophages vers un phénotype M2 pro-tumoral et l'expansion des MDSCs (Carosella et al. 2021). Ce mécanisme aboutit à la phase d'échappement tumoral par l'inhibition des fonctions cytolytiques des cellules effectrices T CD8+ et NK.

In vitro la protéine HLA-G soluble inhibe la maturation de DCs dérivant de monocytes, par diminution de l'expression des CMH II, et ces DCs traitées avec HLA-G induisent l'anergie et un profil immunosuppresseur des cellules T CD4+ et CD8+ (Ristich et al. 2005). Cette inhibition des cellules dendritique par les formes solubles de HLA-G diminue également leur capacité à activer les cellules NK (Gros et al. 2008). De plus la tolérisation des DCs par HLA-G entraîne, dans un modèle murin, le retard du rejet de greffes de peau allogénique, ce qui appuie l'hypothèse du rôle immunosuppresseur de ce sous type de cellules dendritiques (Ristich et al. 2007). Ces deux études ont été réalisées grâce à des cellules myéloïdes provenant d'un modèle de souris transgéniques exprimant ILT4 sous le contrôle du promoteur CD11c.

L'équipe de Gregori *et al.* a mis en évidence en 2010 une sous population de cellules dendritiques tolérogènes exprimant l'IL-10, une interleukine anti-inflammatoire qui lorsqu'elle active son récepteur IL-10R entraîne la régulation négative de la voie de présentation de l'antigène par les CPA et l'augmentation de l'expression de molécules immunorégulatrices (Comi, Amodio, and Gregori 2018). L'IL-10 promeut également, par une boucle d'action rétroactive, l'expression d'HLA-G à la surface des DCs-10. Ces cellules participent à l'inhibition des cellules myéloïdes par l'axe HLA-G/ILT4. Ces DC tolérogènes induisent également la différenciation des cellules T en T régulatrices de type 1 (Tr1), un sous type de cellules T CD4+ qui expriment LAG3 et un cocktail d'interleukines anti-inflammatoires (Gregori et al. 2010). Cette sous population de DCs est présente dans le sang périphérique de patients sains, mais

elle a été observée en plus grande quantité dans le sang de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe. Une autre équipe a également observé l'augmentation de la proportion de cette population DC-10 exprimant HLA-G chez des patients atteints de cancers gastriques (Xu et al. 2016).

Chez les femmes enceinte, la surexpression d'ILT4 par la population de MDSC granulocytiques à l'interface foëto-maternel a été rapportée (Köstlin et al. 2017). Le récepteur est activé par des formes solubles d'HLA-G, entraînant la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription STAT3 dans ces cellules, et l'induction de l'expression d'IDO. L'axe HLA-G/ILT4 est donc impliqué dans la fonction immunosuppressive de cette population cellulaire

c. Les cancers exprimant le point de contrôle immunitaire HLA-G/ILT4

La surexpression d'HLA-G dans certains types de cancers solides et son implication dans la mise en place du TME ont été mises en évidence, notamment dans les cancers du rein, colorectal, de l'œsophage, pancréatique et des carcinomes hépatiques (Loustau et al. 2020).

Le mécanisme d'action du rôle immunomodulateur d'HLA-G implique son interaction principalement avec ILT2 entraînant notamment l'inhibition des cellules NK et des lymphocytes T CD8+. Cependant, l'expression d'isoformes de HLA-G non liées à la B2m laisse penser qu'ILT2 ne serait pas le seul récepteur impliqué. Une étude réalisée sur des tissus de patients atteints de carcinomes du rein à cellules claires (ccRCC) a montré l'expression d'ILT4 et d'HLA-G sur des macrophages et des lymphocytes infiltrants, ainsi que la présence de facteurs angiogéniques (protéines de la famille VEGF) (García et al. 2020). Afin d'évaluer s'il existe un lien entre la présence de ces trois molécules, les auteurs ont développé un modèle de RCC, utilisant la lignée cellulaire RCC7, transduite avec les ADN complémentaires (ADNc) de HLA-G ou ILT4. Une analyse par RT-PCR a montré une forte induction de l'expression de VEGF-C dans les lignées RCC-HLA-G et RCC-ILT4 en comparaison à la lignée wild type (WT), établissant un lien entre la voie HLA-G/ILT4 et l'induction de mécanismes pro-angiogéniques. L'induction de l'expression de VEGF-C par ILT4 a également été rapportée dans un modèle cellulaire de cancer du poumon non à petite cellules, par la voie de signalisation ERK (Zhang, Guo, et al. 2015).

3) ILT4, un antigène associé aux tumeurs (axe ANGPTL2/ILT4)

a. *ANGPTL2, une molécule pro-inflammatoire*

Entre 1999 et 2004, plusieurs études permettent l'identification d'une nouvelle famille de sept protéines ayant une structure similaire aux angiopoïétines. Oike et al rapportent qu'une protéine humaine, qu'ils nomment « angiopoitein related growth factor », permet, chez la souris, la prolifération et la régénération de cellules de l'épiderme (Oike et al. 2004). Les deux familles de protéines sont des protéines solubles, composées d'un domaine N-terminal de type coiled-coil permettant l'oligomérisation et un domaine C-terminal fibrinogène-like et spécifique d'un récepteur (Carbone et al. 2018). Elles sont exprimées dans un grand nombre de tissus comme le foie, les systèmes vasculaire et hématopoïétique. Le rôle des protéines angiopoïétines dans l'angiogenèse via l'activation de leurs récepteurs Tie1 et Tie2, exprimés à la surface des cellules endothéliales, a été largement étudié (Kadomatsu et al. 2014). En revanche les protéines angiopoïétines-like (ANGPTL) ne reconnaissent pas ces deux récepteurs, elles ont été considérées comme des ligands orphelins jusqu'en 2012. Une étude a démontré que l'interaction entre les protéines ANGPTL2, 5 et les récepteurs inhibiteurs ILT4 et PIR-B à la surface des cellules souches hématopoïétiques permettent leur prolifération *ex-vivo* (Zheng et al. 2012). Cependant, les protéines de cette famille reconnaissent différents types de récepteurs, et bien que leurs fonctions soient majoritairement liées à l'angiogenèse, au métabolisme du glucose et des lipides, et à l'inflammation, elles ont parfois des actions opposées.

En effet l'ANGPTL1, première protéine de la famille identifiée, a été nommée angioarrestin car elle inhibe la prolifération et l'adhésion des cellules endothéliales, réduisant l'angiogenèse et jouant ainsi un rôle antitumoral. On voit bien que les rôles et mécanismes d'action de ces protéines sont complexes et restent encore pour beaucoup à étudier. D'autres, comme l'ANGPTL7 et 8, sont toujours considérées comme des ligands orphelins.

Les ANGPTLs sont impliquées dans différents processus de maintien de l'homéostasie des tissus. Un déséquilibre du niveau d'expression de ces protéines entraîne donc des dérégulations homéostatiques, menant à des maladies liées au métabolisme comme le diabète, et des maladies résultants de la sur-inflammation comme certains types de cancers. Notamment, la surexpression d'ANGPTL2 a été rapportée dans les cancers de l'œsophage,

colorectal, de la prostate, du pancréas, du poumon, du sein, de la peau et des carcinomes hépatiques (Carbone et al. 2015, 2018).

L'ANGPTL2 est une glycoprotéine soluble présente dans différents organes, comme le cœur, le tissu adipeux, le poumon, les reins et les muscles squelettiques dont l'expression est stimulée par l'hypoxie (Santulli, 2014). Deux récepteurs de l'ANGPTL2 ont été jusqu'à présent identifiés : le récepteur ILT4 et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Son activité pro inflammatoire, angiogénique et de remodelage de la MEC est médiée par l'activation de ce dernier à la surface des cellules endothéliales (Figure 12, adaptée de Kadomatsu et al, 2014).

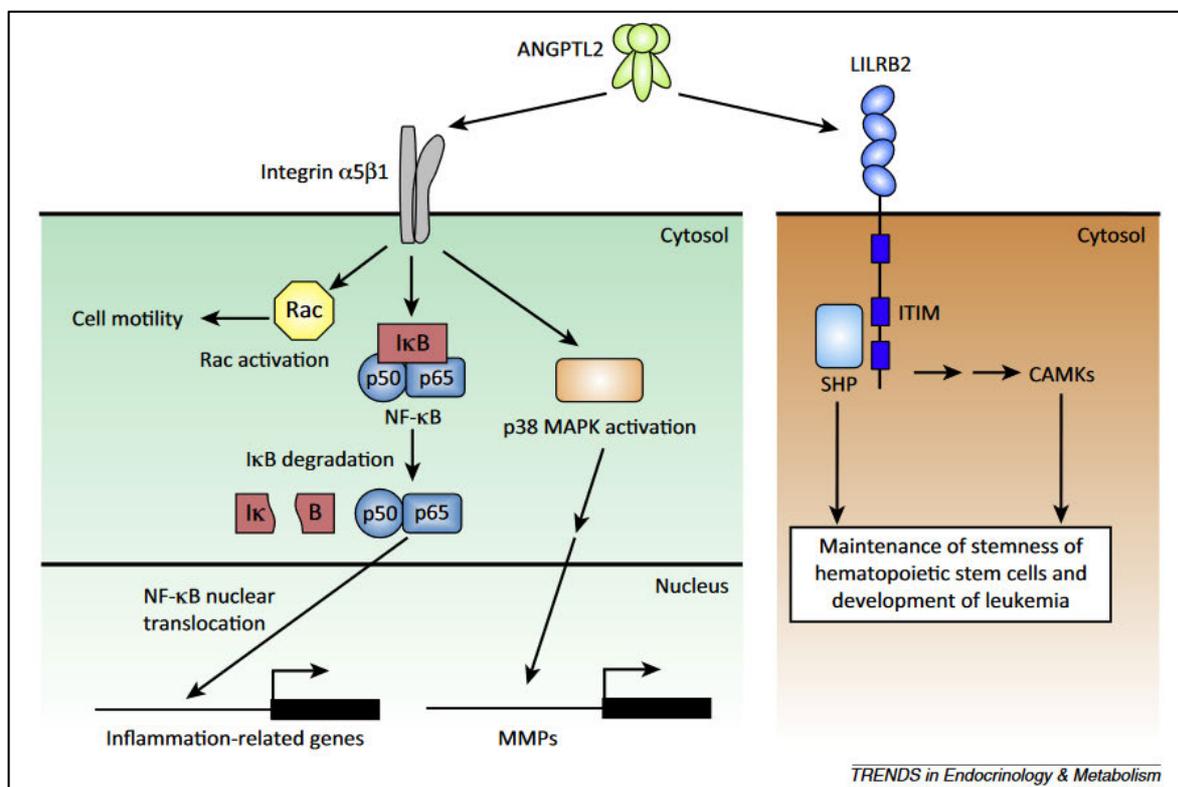


Figure 12 : Les voies de signalisation activées par l'ANGPTL2 après fixation à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou à l'ILT4

Une première étude en 2012 décrit l'interaction entre l'ILT4 et l'ANGPTL2 dans les cellules souches hématopoïétiques. L'engagement d'ILT4 par l'ANGPTL2 dans ces cellules active la voie de signalisation SHP2/CAMK-4 et maintient la population des cellules souches hématopoïétiques (Zheng et al. 2012). De plus, un modèle murin de leucémie aigüe a permis

de montrer que l'ANGPTL2 reconnaît le récepteur PIR-B, et que son activation entraîne la prolifération des cellules tumorales.

Les domaines de liaison de l'ILT4 à l'ANGPTL2 ont été déterminés par l'analyse de l'affinité du ligand pour différentes protéines ILT4 tronquées ou mutées (Deng et al. 2014). Les domaines D1 D2 sont majoritairement impliqués dans l'interaction avec ANGPTL2, comme cela a été décrit pour HLA-G. Il apparaît qu'un épitope du domaine D4 serait également impliqué dans l'interaction avec l'ANGPTL2 mais qu'il ne soit pas déterminant.

b. Le rôle de l'ANGPTL2 dans le cancer

L'inflammation chronique joue un rôle crucial dans le développement cancéreux, qu'elle en soit la cause ou un facteur de maintien. L'expression de l'ANGPTL2 et l'inflammation chronique étant corrélées, de nombreuses études effectuées chez des patients atteints de cancers depuis les années 2010 ont permis de relier une augmentation de l'expression de l'ANGPTL2 au développement tumoral (Carbone et al. 2018). C'est le cas pour des cancers de l'œsophage, colorectal, prostate, pancréas, du poumon, sein et de la peau. Cette expression peut s'expliquer notamment par l'hypoxie présente dans le microenvironnement tumoral, qui est un des facteurs d'activation de l'expression de l'ANGPTL2. En effet, l'expression d'enzymes de déméthylation est induite dans ces conditions hypoxiques, aboutissant à la déméthylation du promoteur de l'ANGPTL2 (Odagiri et al. 2014). Une étude réalisée chez des patients atteints de cancers de la thyroïde a mis en évidence que les tissus cancéreux surexpriment l'ANGPTL2, et que cette surexpression entraîne leur prolifération et est associée à un mauvais pronostic (Yang et al. 2019). Son rôle dans le développement tumoral semble lié à ses propriétés pro-angiogéniques, anti-apoptotiques et de promotion de la migration cellulaire, mais les mécanismes moléculaires exactes restent à étudier (Carbone et al. 2018).

Cependant, plusieurs études décrivent son rôle dans le cancer via l'interaction avec deux de ses ligands identifiés.

L'activation de $\alpha 1b5$ par l'ANGPTL2 promeut la migration des cellules tumorales et accélère la formation de métastases dans le cancer du poumon, du sein et l'ostéosarcome (Horiguchi et al. 2019) (Odagiri et al. 2014) (X. Wang et al. 2019).

Une étude *in vitro* décrivant l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2 sur des cellules tumorales a permis d'établir un lien direct entre l'activation du récepteur par l'ANGPTL2 et l'augmentation

de la prolifération tumorale (Liu et al. 2015). Les auteurs démontrent que l'ILT4 est surexprimé dans des tumeurs du poumon humain et que son activation à la surface de lignée de cellules de carcinome de poumon promeut leur prolifération. En effet, la déficience d'expression d'ILT4, induite par des ARN interférant, entraîne une diminution de la prolifération des cellules en présence d'ANGPTL2, par rapport aux cellules normales. Les auteurs ont de nouveau identifié l'activation de la voie de signalisation SHP/CAMK à la suite de l'activation d'ILT4 dans ces cellules.

Dans un modèle de lignée cellulaire de cancer du pancréas, l'inhibition de l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2 par un anticorps antagoniste d'ILT4 diminue la prolifération des cellules. (Carbone et al. 2015). Il semble donc que dans ces cellules tumorales, ILT4 entraîne l'inhibition de voies de régulation de la prolifération cellulaire (Loustau et al. 2020).

Le rôle de l'ANGPTL2 dans le cancer semble cependant être à deux facettes, selon le type de cellules sur lequel il se fixe. En effet, une étude a montré que l'activation de PIR-B sur des cellules dendritiques entraîne leur maturation et l'augmentation de l'immunité antitumorale. Ce mécanisme va à l'encontre du rôle des récepteurs inhibiteurs ILTs/PIR-B décrit jusqu'ici (Horiguchi et al. 2019).

Bien qu'aucune étude clinique n'ait décrit directement l'interaction entre l'ANGPTL2 et ILT4 comme un facteur de progression tumorale, He et al. ont identifié en 2018 que la surexpression d'ANGPTL2 et d'ILT4 est un biomarqueur prédictif de métastases dans le cancer colorectal (He et al. 2018). L'expression de l'ANGPTL2 est corrélée avec la présence de métastase dans le cancer du poumon (Sasaki et al. 2012). Il est donc supposé que l'axe l'ANGPTL2/ILT4 serait impliqué dans le développement des tumeurs exprimant ILT4 (Shao et al. 2018).

4) Cibler ILT4 en immunothérapie antitumorale

Bien que tous les mécanismes exacts par lesquels ILT4 promeut la prolifération cancéreuse restent à étudier, l'ILT4 apparaît comme une cible prometteuse en immunothérapie, selon deux axes d'action. La première stratégie consiste à bloquer le récepteur exprimé par les cellules myéloïdes infiltrées, non pas pour les dépléter mais pour reprogrammer les TAMs ou MDSCs vers un phénotype antitumoral. Ensuite, l'activation d'ILT4 à la surface de cellules cancéreuses

entraînant l'inhibition de la régulation des voies de prolifération cellulaires, bloquer l'ILT4 exprimé par les cellules tumorales pourrait directement limiter leur prolifération.

Une étude de caractérisation d'un anticorps IgG4 antagoniste d'ILT4 *in vitro* et *in vivo* apporte une première preuve de concept d'une thérapie bloquant ILT4 pour reprogrammer les TAMs (Chen et al. 2018). L'affinité de cet anticorps pour ILT4 a été mesurée entre 2 et 4 nM, et aucune réactivité croisée avec les récepteurs LILRB1, 3, 4 et LILRA1 n'a été observée.

Plusieurs modèles dans cette étude ont permis de mettre en évidence que l'inhibition d'ILT4 à la surface des macrophages permet d'augmenter l'activité antitumorale. Tout d'abord, des monocytes incubés avec l'anticorps anti-ILT4 sont insensibles à un protocole de différenciation en macrophages de type M2, par l'incubation avec le M-CSF et l'IL4. En effet, la phosphorylation de SHP1 associée à l'ILT4 était diminuée chez les macrophages traités par l'anticorps antagoniste, induisant l'activation de la voie de signalisation STAT/6 liée à un phénotype de macrophages M1. Ensuite, dans un modèle de xénotransgreffe dans des souris humanisées, l'injection de l'anti-ILT4 en combinaison avec un anti-PD1 diminue la masse tumorale. Les auteurs n'ont pas identifié ici le ligand responsable de l'activation d'ILT4 avec lequel l'anticorps antagoniste entre en compétition.

Le modèle proposé de l'implication d'ILT4 dans le développement tumoral est schématisé sur la Figure 13.

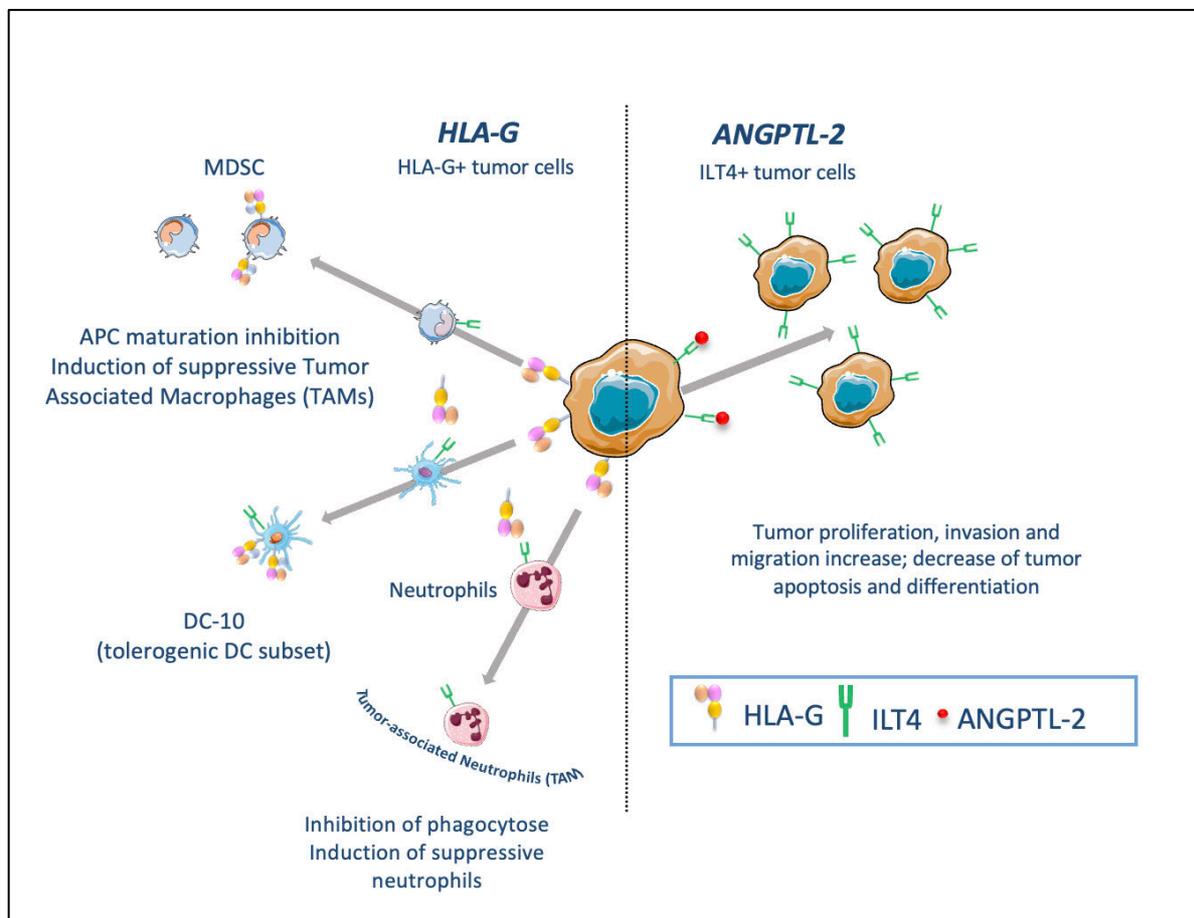


Figure 13 : Représentation schématique de l'implication d'ILT4 dans le développement tumoral.

La pertinence de cibler ILT4 en thérapie a conduit deux groupes pharmaceutiques à développer des anticorps bloquant les ligands HLA-G et ANGPTL2 et entrés en étude clinique de phase I en 2021 : Merck Sharp & Dohme Corp. (MSD) avec l'anticorps MK-4830 et Jounce Therapeutics avec l'anticorps JTX-8064.

Les données pré cliniques de Jounce Therapeutics ont fait l'objet de présentation lors des congrès (Cohen et al. 2019; Hashambhoy-ramsay et al. 2020.). Les auteurs ont validé la capacité de leur anticorps à entrer en compétition avec HLA-G et HLA-A sur des cellules exprimant ILT4. De plus, le traitement de macrophages humains différenciés en phénotype M2-like avec l'anticorps anti-ILT4 permet leur reprogrammation en M1. En effet, le traitement restaure

l'expression de TNF α et diminue la sécrétion d'IL-10. L'analyse du transcriptome de ces macrophages confirme également qu'ils présentent un phénotype similaire aux macrophages de type M1-like.

Les premiers résultats de l'étude de phase I de l'anticorps MK-4830 (Siu et al. 2022) ont montré que le traitement est bien toléré et n'a pas induit de toxicité non attendue. La fixation de l'anti-ILT4 a été confirmée à la surface de monocytes et de granulocytes. Une réponse partielle a été observée chez 11 des 34 patients traités avec la combinaison MK-4830 et pembrolizumab (AcM anti-PD-1), parmi lesquels 5 étaient précédemment traités et réfractaires au pembrolizumab. Une étude de différents biomarqueurs prédictif a été réalisée, entre autres des marqueurs de la population de MDSCs, PD-L1 et HLA-G, mais les résultats ne sont pas concluants pour l'instant. Il semble donc que bloquer ILT4 permet en partie de lever la tolérance à la thérapie anti PD-1/PD-L1.

III. Les VHH, des formats d'anticorps alternatifs

1) L'origine des VHH

a. La découverte des anticorps à chaîne lourde de camélidés

La première référence aux anticorps à chaîne lourde date de 1987, lorsque Ungar-Warom et al. (1987) observent la présence dans le sérum de dromadaire d'un format d'une protéine Ig-like de plus faible poids moléculaire que les anticorps classiques. La structure de ces anticorps a été décrite quelques années plus tard dans le laboratoire du Pr. Raymond Hamers à l'Université de Bruxelles, qui constate que ces Immunoglobulines G (IgG) de plus faible poids moléculaire, isolées à partir de sérum de chameau, sont dépourvues de chaînes légères et du premier domaine constant CH1 au niveau de la chaîne lourde (HamersCasterman et al. 1993). Cette observation contredit le format conventionnel des anticorps connu jusqu'alors : les anticorps de mammifères sont des hétéro-tétramères formés de deux chaînes lourdes (HC pour Heavy Chain) associées à deux chaînes légères (LC pour Light Chain) et cette structure est largement conservée à travers les espèces. Encore plus surprenant : contrairement aux anticorps à chaîne lourde non fonctionnels précédemment détectés chez l'Homme dans certains contextes pathologiques, ces anticorps homo-dimériques de camélidés sont parfaitement fonctionnels.

Ils semblent même jouer un rôle important dans l'immunité des camélidés, car ils représentent 50 à 80% des anticorps chez les chameaux, et environ 25% chez les camélidés d'Amérique Latine (Muyldermans 2013). Au-delà de l'aspect intrigant de ce format d'anticorps non conventionnel, le laboratoire du Pr. Raymond Hamers prédit déjà en 1993 les avancées majeures que permettra ce nouveau format dans le domaine de l'ingénierie des anticorps (HamersCasterman et al. 1993). En effet, il est possible d'isoler la séquence ADN codant pour le domaine variable de ces anticorps à chaîne lourde (hcAb) par des techniques de biologie moléculaire, puis de produire la protéine recombinante correspondante. C'est cette protéine d'environ 15 kDa et 3 nm de diamètre, qu'on appelle Nanobody ou VHH. Ce nouveau format d'anticorps à domaine unique, près de 10 fois plus petit que les IgG conventionnelles, conserve les propriétés de reconnaissance des anticorps tout en ayant des propriétés biochimiques des petites molécules.

Dans cette dernière partie de l'introduction, nous présenterons la structure et les propriétés uniques des VHH, ainsi que leurs applications.

b. La structure des IgG conventionnels et homodimériques

La Figure 14 (adaptée de Bannas et al. 2017) illustre les différences structurales entre les anticorps conventionnels et homodimériques. Les premiers sont constitués de deux chaînes lourdes, formées chacune de trois régions constantes et d'une région variable, associées à deux chaînes légères. Les domaines constants CH2 et CH3 de la chaîne lourde forment la région Fc, impliquée dans l'activation du système immunitaire via leur reconnaissance par des récepteurs à Fc (FcR) à la surface des cellules immunitaires. La région charnière ou hinge en anglais, située entre le fragment Fc et la région CH1 forme des ponts disulfure, qui stabilisent le dimères formé par les deux chaînes lourdes. Sur la région CH1, se situe une cystéine permettant la formation d'un pont disulfure avec la région constante de la chaîne légère.

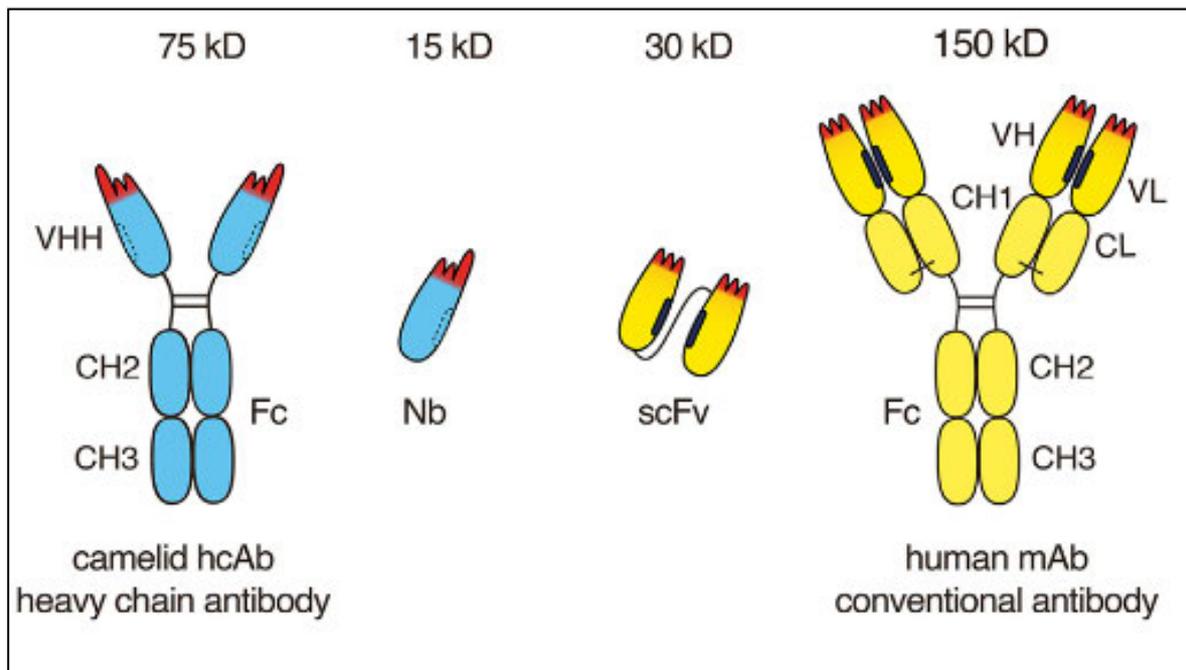


Figure 14 : Comparaison de la structure des IgG conventionnels et des hcAb de camélidés

La première différence entre les anticorps conventionnels et les hcAb provient de l'absence de la région CH1 sur ces derniers. Cette différence est d'origine génétique : il a été montré au laboratoire que les deux types d'anticorps chez les camélidés, sont générés à partir de gènes situés sur le même locus IgH du chromosome 4 des camélidés (Achour, Lafaye et al. 2008). L'organisation structurelle des gènes codant pour les deux types d'anticorps est similaire. Ils sont constitués de gènes codant soit pour les régions variables VH (IGHV) soit pour les régions VHH (IGHVH), suivis d'un cluster unique d'éléments D et J, puis des régions codant pour les domaines constants. Sur les gènes codant pour les régions constantes des hcAb, une mutation dans l'intron entre les exons du domaine CH1 et de la région charnière entraîne l'élimination du CH1 par épissage alternatif de l'ARNm (Figure 15 adaptée de Muyldermans 2013).

En raison de l'absence de cette région CH1, le domaine de reconnaissance des deux types d'anticorps adopte une structure différente. Pour les anticorps conventionnels, la région variable de la chaîne lourde (VH) s'associe par des interactions hydrophobes à la chaîne légère variable (VL) pour former le paratope. Pour les hcAb, ce paratope est formé uniquement par la région variable de la chaîne lourde, appelée VHH.

Les régions variables des deux types d'anticorps sont constituées de domaines conservés, appelés framework en anglais (FR), qui leur confèrent leur structure, et de régions hypervariables, appelées complementary determining regions (CDR), responsables de leur

spécificité. La structure des domaines VH et VHH est similaire, composée de 3 domaines CDRs et de 4 domaines structuraux FR (Figure 15).

Les régions CDR1 et CDR2 contribuent peu à la diversité de spécificité des anticorps, car elles sont encodées par un nombre limité d'éléments V. Le domaine CDR3 est lui généré par la recombinaison aléatoire des éléments V D et J lors de la sélection clonale des lymphocytes B à la suite de la reconnaissance d'un antigène. Il comporte donc le plus de variabilité génétique et est majoritairement responsable de la spécificité des anticorps (Bannas et al. 2017).

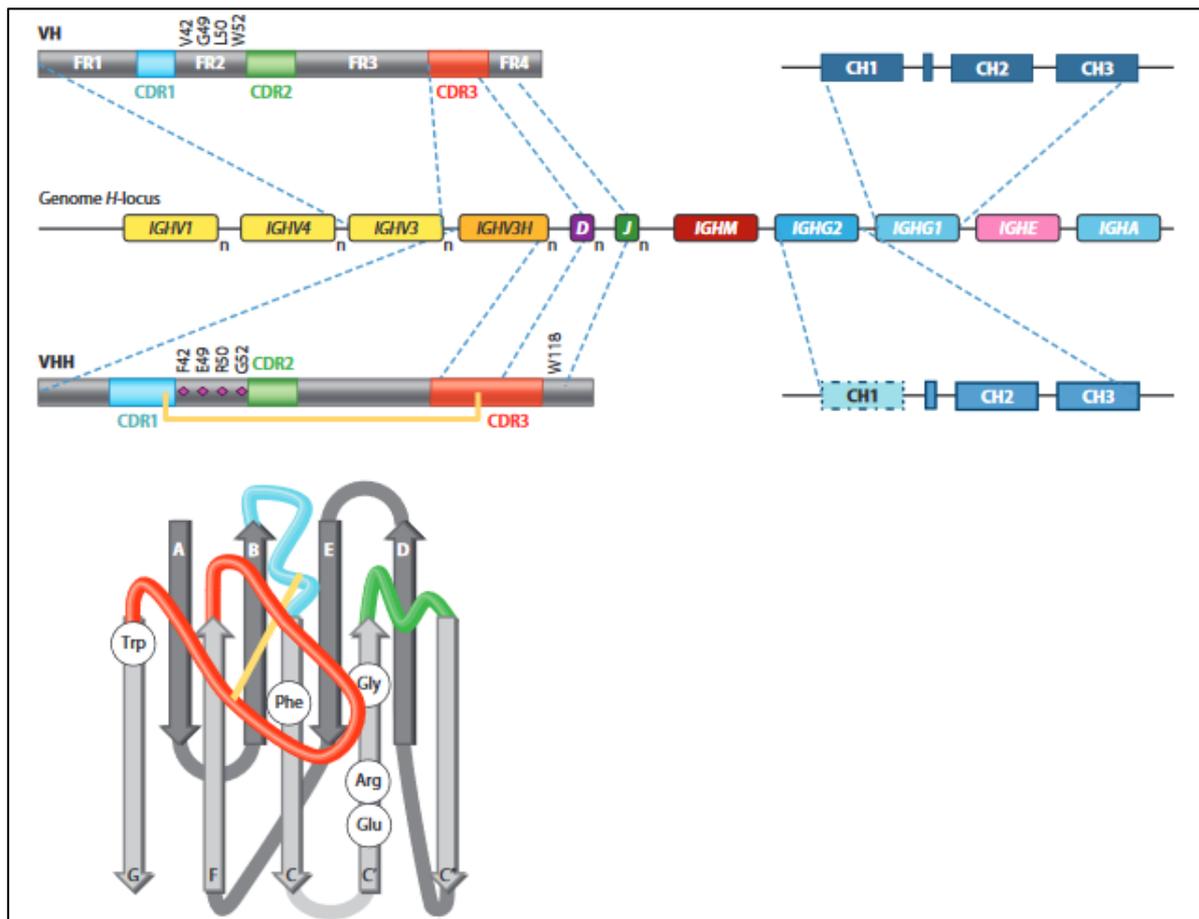


Figure 15 : Structure des gènes IGHV et structure protéique d'un VHH

Le répertoire de reconnaissance d'épitopes des anticorps conventionnels repose donc sur deux paramètres principaux : la génération de régions hypervariables par modifications somatiques et l'association au hasard de deux chaînes variables, une lourde et une légère. La diversité du répertoire des anticorps de camélidés homodimériques est, quant à elle, uniquement due aux recombinaisons aléatoires des segments V, D, J de la chaîne lourde.

La longueur de la région CDR3 des VHH est beaucoup plus variable que celle des VH, entre 3 à 28 acides aminés contre 8 à 15. Il est supposé que cette augmentation de longueur contrebalance l'absence de région VL et permet d'augmenter la surface d'interaction de la chaîne VHH avec l'antigène (Wesolowski et al. 2009). La taille du paratope des anticorps conventionnels varie de 600 à 900 Å² et de 600 à 800 Å² pour les VHH. L'augmentation de la longueur de la boucle CDR3 entraîne également une augmentation de sa flexibilité et de sa mobilité, ce qui est délétère pour la fixation à un antigène. Un mécanisme évolutif a permis de corriger cette conséquence de la longueur du CDR3. Cette boucle est très souvent stabilisée par la formation d'un pont disulfure. De nombreux VHH possèdent une paire de cystéines supplémentaires, permettant la formation d'un pont disulfure entre la région CDR3 et FR1 chez les chameaux, et entre la région CDR3 et FR2 chez les lamas et alpagas (Lafaye and Li 2018). Il a été montré, grâce à la résolution de la structure cristalline d'un VHH neutralisant le virus de l'hépatite C que la boucle CDR3 se recourbe sur le domaine FR2, comme illustré sur la Figure 15 (Tarr, Lafaye et al. 2013). Cette région recouverte du FR2 correspond sur le domaine VH à l'interface avec la région VL. En effet, quatre acides aminés sont hautement conservés dans le FR2 des anticorps conventionnels, en positions 42, 49, 50 et 52 (Muyldermans, 2021). Ce sont des acides aminés hydrophobes qui interagissent avec la chaîne légère pour former le paratope. Dépourvus d'interaction avec une chaîne légère, ces acides aminés sont situés directement à la surface. Il est très intéressant de noter qu'ils sont remplacés dans les VHH par des acides aminés petits ou hydrophiles, pouvant augmenter ainsi la solubilité des VHH.

c. Sélection de VHH par criblage haut débit d'une banque d'ADN

De manière générale, les VHH sont obtenus par l'immunisation de camélidés et la génération d'une banque immunologique d'ADNc complémentaires aux gènes VHH des anticorps, contenant un répertoire avec une diversité de l'ordre de 10⁶ à 10⁹ séquences différentes. Il existe également des alternatives à l'immunisation de camélidés pour l'obtention de VHH, comme des bibliothèques d'ADN synthétiques (Xu et al. 2021). Ces techniques présentent certains avantages, notamment liés à l'inaccessibilité de camélidés, les contraintes réglementaires entourant l'immunisation d'animaux, ou encore lorsque la cible est toxique ou peu immunogène (Jovčevska and Muyldermans 2020).

La sélection d'un VHH spécifique d'un antigène donné repose ensuite sur le criblage de la banque par des méthodes associant génotype et phénotype. Ces méthodes permettent d'isoler

l'ADN codant pour le VHH d'intérêt directement après l'analyse de l'interaction entre le VHH et l'antigène. Les méthodes principalement utilisées sont le phage ou le yeast display et le ribosome display. La première méthode repose sur la génération de bactériophages ou de levures exprimant à leur surface le VHH encodé dans leur matériel génétique (Muyldermans 2021) Dans le cas du ribosome display, la sélection d'un VHH couplé à son ARNm traduit *in vitro*, permet ensuite par rétrotranscription, d'isoler la séquence ADN encodant le VHH spécifique (Bencurova et al. 2015).

2) Les propriétés des VHH et leurs applications

a. Stabilité

Les VHH sont des protéines particulièrement stables (Asaadi et al. 2021). La grande majorité des VHH peut être conservée à 4°C pendant des mois sans perdre leurs propriétés de fixation à son antigène, et résistent également à de fortes températures (Muyldermans 2013). Ils sont aussi très résistants à la dénaturation chimique. La mutation d'acides aminés en cystéines pour former un pont disulfure dans la région FR3 augmente également leur stabilité et les protège notamment de certaines protéases, permettant leur adsorption par voie orale.

Les VHH ont été adaptés à de nombreux systèmes de détection en laboratoire comme les ELISA ou des systèmes de senseurs électrochimiques, mais aussi en dehors de laboratoire comme des tests de diffusion sur bandelettes. Ces tests sont utilisés en santé humaine et animale pour le diagnostic d'infections mais également en agriculture et dans l'industrie agroalimentaire pour rechercher la présence de toxines ou de polluants. La robustesse des VHH dans des conditions variables de températures et de pH en font des outils particulièrement intéressants pour ces applications qui nécessitent l'utilisation de tests en dehors des paramètres bien contrôlés d'un laboratoire (Muyldermans 2021).

b. Epitopes reconnus

Le paratope du VHH peut adopter une structure convexe, grâce à la flexibilité de la boucle formée par la région CDR3, contrairement au paratope principalement plat formé par les VH-VL des anticorps conventionnels. Par conséquent, les VHH sont capables de reconnaître des sites différents de ceux reconnus par les IgG conventionnels et notamment des épitopes situés dans des cavités, dits cryptiques (Bannas et al. 2017). Cette particularité a été observée par la

résolution de structures par cristallographie de plusieurs complexes VHH/antigène. Une étude comparant les mécanismes d'inhibition du récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) par un anticorps de référence, cetuximab et trois VHH, a permis de déterminer et d'analyser les différences d'épitopes reconnus (Schmitz et al. 2013). Deux des trois VHH étudiés reconnaissent un épitope concave sur l'EGFR, dont la fixation empêche le changement conformationnel nécessaire pour la fixation des ligands et la dimérisation du récepteur impliquant que ces 2 VHH sont des anticorps bloquants prometteurs en thérapie.

c. Faible immunogénicité

Les régions framework des VHH sont à 90% homologues à la famille 3 des chaînes lourdes des anticorps humains (HamersCasterman et al. 1993) ce qui peut expliquer leur faible immunogénicité chez l'Homme. En effet, plusieurs essais cliniques en imagerie exploitent des VHH non-humanisés et aucun effet indésirable n'a été rapporté à ce jour (Ackaert et al. 2021). Cependant, l'imagerie ne nécessite qu'une injection et on peut penser que dans le cadre d'une thérapie, une réponse immunitaire anti-VHH pourrait être montée à la suite des injections répétées du traitement. La nécessité de l'humanisation des VHH pour des applications chez l'Homme semble donc dépendre du type d'application. En conséquence et par précaution, de nombreux groupes pharmaceutiques décident d'humaniser les VHH au cours du développement de la molécule pour des applications thérapeutiques. L'humanisation des VHH consiste à muter certains acides aminés présents dans les régions framework, sans altérer l'affinité du VHH pour sa cible (Vincke et al. 2009). Le premier et pour l'instant unique VHH thérapeutique approuvé, le VHH bivalent caplacizumab développé par la société Ablynx, est d'ailleurs humanisé. Il cible le facteur de von Willebrand et est utilisé dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique (Scully et al. 2019).

d. Facilité de production

Les anticorps IgG conventionnels sont des glycoprotéines complexes de 150 kDa formées de 4 chaînes protéiques associées par des ponts disulfures, et les régions constantes de la chaîne lourde sont fortement glycosylées. La production de telles protéines pour des applications cliniques nécessite des procédés de bio-production en cellules eucaryotes robustes, afin d'optimiser le rendement de production et maintenir le profil de glycosylation entre chaque lot produit. En effet, le profil de glycosylation du fragment Fc des anticorps influence leur stabilité

et joue un rôle important dans leur activité *in vivo*, pour l'activation du système immunitaire et la pharmacocinétique (Abès and Teillaud 2010) (Beck et al. 2019) (Joubert et al. 2019).

Les VHH étant composés d'une seule chaîne protéique non glycosylée, ils sont facilement produits par des systèmes procaryotes ou eucaryotes simples comme les levures. Par exemple caplacizumab utilisé dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis est produit en bactéries *Escherichia coli* (Sargentini-Maier et al. 2019). Plus facile à mettre en place que les procédés de production en cellules de mammifères, ces procédés de production en bactéries sont aussi moins longs et moins coûteux (Owczarek et al. 2019).

e. Faible demi-vie, un atout en imagerie

La faible demi-vie des VHH a été confirmée par différentes études *in vivo*, qui établissent à environ 30 minutes la demi-vie d'un VHH contre 24h pour une IgG classique (Hoefman et al. 2015). En effet, en raison de leur petite taille, les VHH sont très rapidement éliminés par la filtration glomérulaire dans le rein, qui dépend principalement de la taille des molécules et de leur charge. De manière générale, les molécules de taille inférieure à 6 nm sont éliminées à travers les pores de la couche de cellules épithéliales des glomérules rénaux (Griffiths et al. 2019). Cela correspond à des protéines de poids moléculaire d'environ 60 kDa. De plus, dépourvus de région Fc, les VHH ne sont pas retenus pas les récepteurs Fc néonataux (FcRn) présents à la surface des cellules endothéliales, un mécanisme qui permet d'augmenter la durée de vie des anticorps circulants (Kim et al. 2007).

Cette caractéristique présente à la fois des avantages et des inconvénients en fonction de leur application. Le diagnostic *in vivo* par imagerie ou *in vitro* par marquage immunohistochimique permet de prédire la réponse d'un patient à un traitement anti-cancéreux et donc d'orienter le choix du traitement. Il est possible de coupler des VHH à des fluorochromes, des isotopes radioactifs pour les scanner par tomographie à émission de positons (PET-Scan) ou des contrastophores pour l'IRM (Li et al. 2016).

En imagerie, ils permettent d'obtenir des images avec un meilleur contraste que les anticorps conventionnels. En effet, le format monomérique injecté par voie intraveineuse diffuse rapidement dans les tissus cibles par exemple pour le cas de tumeur solides (Debie et al. 2020) et sont éliminés très rapidement par la filtration rénale. Une étude a montré qu'il est possible d'obtenir des images d'une tumeur *in vivo* rapidement après injection d'un VHH spécifique d'un antigène de tumeur, avec un bruit de fond considérablement réduit par rapport à un anticorps

conventionnel (Bannas et al. 2015). Ainsi il est possible de réaliser l'analyse le jour de l'injection du VHH, tandis que l'imagerie est généralement réalisée 24h à 48h après injection d'un anticorps conventionnel. Des VHH biotraceurs ont été générés pour analyser différents paramètres de la tumeur, comme l'expression d'antigènes associés aux tumeurs ou la polarisation des cellules immunitaires infiltrées. Des VHH couplés à des isotopes radioactifs ciblant l'antigène HER2, des marqueurs de sous population de macrophages pro-tumoraux ou des lymphocytes T CD8⁺ sont actuellement en phase d'essais cliniques (Chanier and Chames 2019). Cependant, cette faible demi-vie est une limite à l'exploitation en immunothérapie du format parental des VHH. Nous reviendrons par la suite sur les modifications qui peuvent être apportées aux VHH afin d'accroître leur demi-vie.

f. Expression intracellulaire

La stabilité des VHH dans des milieux réducteurs comme le cytosol est une propriété unique de ces anticorps simple chaîne qui est particulièrement intéressante pour cibler des molécules intracellulaires. En effet, de nombreux VHH restent actifs dans un environnement réducteur (Soetens et al. 2020). Un VHH spécifique de la protéine cytoplasmique Tau, impliquée dans des maladies neurodégénératives, est capable d'atteindre sa cible à partir d'une injection en intraveineuse, impliquant que le VHH est internalisé par la cellule et qu'il reste fonctionnel dans le milieu réducteur du cytoplasme (Li et al. 2016).

Fusionnés à des traceurs fluorescents, ils sont de très bons outils de recherche pour visualiser des protéines *in cellulo*. Les chromobodies, synthétisés par la cellule sous forme de protéine recombinante fusionnée à une protéine fluorescente, permettent de suivre leur cible intracellulaire dans des cellules vivantes (Keller et al. 2018). Par exemple, la protéine H2AX est impliquée dans la formation des histones. Le marquage intracellulaire par un VHH spécifique des formes phosphorylées γ H2AX, caractéristiques de dommages liés à l'ADN, permet de suivre quantitativement l'évolution de ce biomarqueur (Moeglin et al. 2021).

La synthèse de nanobodies directement par la cellule tumorale est également étudiée pour une approche thérapeutique. Par exemple, une équipe a étudié la capacité d'inhibition d'HIF1 α , facteur de transcription activé en conditions hypoxiques et impliqué dans le développement tumoral, par un VHH exprimé directement en intracellulaire par la tumeur (Groot et al. 2008).

g. Passage de la barrière hématoencéphalique

De la même manière que les VHH peuvent être internalisés par les cellules, il a été rapporté qu'ils sont capables de franchir la barrière hématoencéphalique (Lafaye, Lesuisse, and Declèves 2019). Plusieurs hypothèses concernant ce mécanisme de diffusion ont été avancées, comme la diffusion passive ou la transcytose. La capacité d'internalisation cellulaire a été reliée entre autres au point isoélectrique (pI) basique et aux charges de surface positives du VHH. En effet, les mutations permettant d'augmenter le pI d'un VHH, et ainsi d'améliorer sa capacité à franchir la barrière hématoencéphalique sont actuellement étudiées et développées (Li et al. 2012) (Li et al. 2016). Ceci a été montré pour des applications de diagnostic *in vivo* en imagerie, avec deux VHH ciblant les protéines β -amyloïde et Tau hyperphosphorylée, des marqueurs de développement de la maladie d'Alzheimer.

h. Pénétration des tissus

La meilleure diffusion tissulaire des VHH après injection intraveineuse est également un autre de leurs attributs (Bannas et al. 2017; Muyldermans 2021). Cette propriété a été avancée comme étant un atout pour la pénétration des tumeurs solides. En effet, dans les tissus sains, il existe une différence de pression entre les vaisseaux sanguins et l'espace interstitiel, permettant la diffusion de molécules du sang vers l'espace intercellulaire et les vaisseaux lymphatiques. Dans les tumeurs solides en revanche, la pression interstitielle est supérieure aux tissus adjacents, limitant la diffusion passive de larges molécules. (Kijanka et al. 2015). Cependant, en pratique, il semble que la demi-vie plus importante des anticorps IgG conventionnels dans le plasma améliore leur diffusion tumorale (Kitten and Martineau 2019). En effet, la pénétration tumorale repose majoritairement sur deux facteurs : la diffusion de la molécule dans les tissus, et le temps de rétention plasmatique, lié principalement à l'élimination par les reins et la présence ou non d'un fragment Fc. La forte affinité d'un anticorps pour son ligand peut également limiter la diffusion dans la tumeur, par un mécanisme appelé le « binding site barrier effect » (Fujimori et al. 1989) (Rudnick and Adams 2009) (Rudnick et al. 2011) qui restreint la présence des anticorps aux cellules tumorales périphériques. De nombreuses études expérimentales et de modélisation ont visé à déterminer le poids moléculaire permettant la meilleure pénétration tumorale. Des modèles mathématiques (Schmidt and Wittrup 2009; Wittrup et al. 2012) tentent de prédire la capacité de pénétration tumorale selon les propriétés des anticorps, comme leur taille, leur valence,

l'affinité pour l'épitope, la présence ou non d'une région Fc, et les paramètres physiologiques tels que la clearance rénale, la diffusion dans les tissus et à travers les vaisseaux. Un de ces modèles, dont la représentation graphique est illustrée sur la Figure 16 (adaptée de Wittrup et al, 2012) prédit le lien entre charge tumorale et taille de la molécule. Il apparaît ici qu'une molécule de 3 nm (VHH illustrée par la flèche bleue) aurait une capacités de pénétration tumorales plus faible qu'une molécule de 15 nm (IgG).

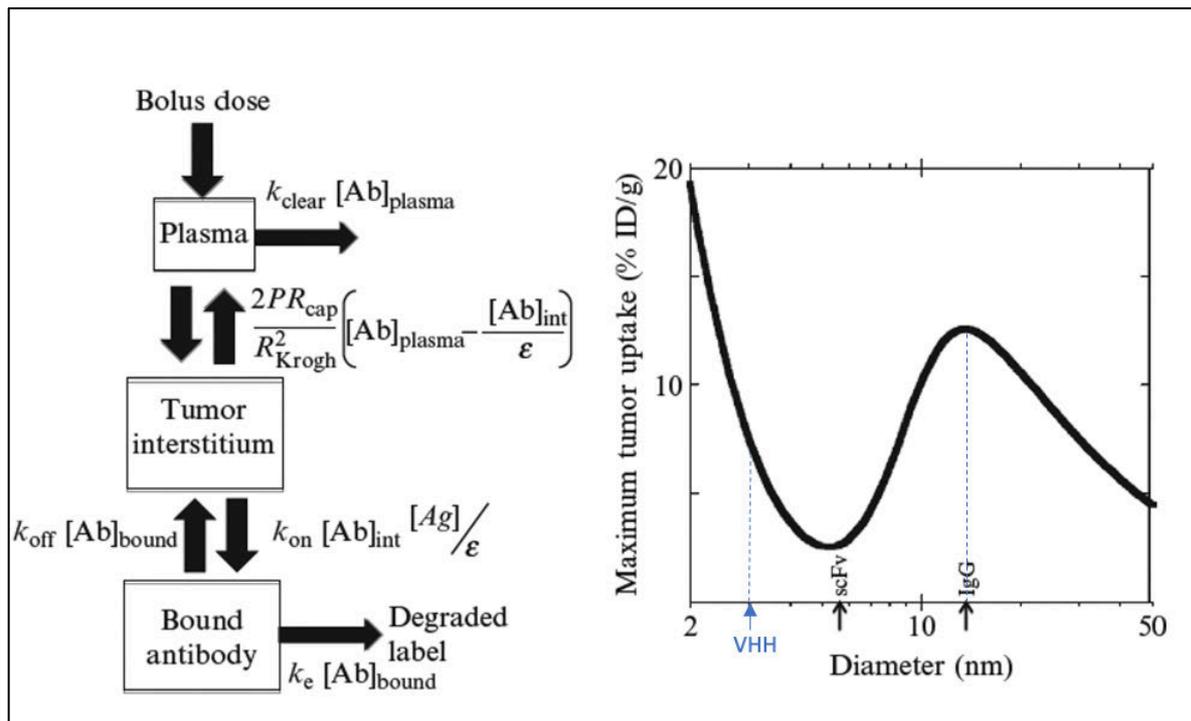


Figure 16 : Corrélation entre la taille d'un anticorps et la pénétration tumorale

La théorie de la meilleure capacité des VHH à cibler les tumeurs en thérapie reste donc aujourd'hui source de discussion. L'avantage majeur des VHH dans cette application pourrait être la faible diffusion dans des tissus non spécifiques, liée à l'absence de région Fc et donc d'interaction avec leurs récepteurs, notamment les FcRn. Une étude dans un modèle de souris porteuses de tumeurs HER2+ a permis de comparer la demi-vie mais également la diffusion d'un VHH et d'une IgG classique tous deux spécifiques de HER2 (Debie et al. 2020). Les auteurs ont constaté que trastuzumab, l'anticorps anti HER2 de référence, atteignait la plus forte densité intra tumorale mais, en contrepartie, avait diffusé dans des sites non spécifiques.

La Figure 17 (adaptée de Muyldermans 2020) résume les différents aspects des VHH présentés dans cette partie.

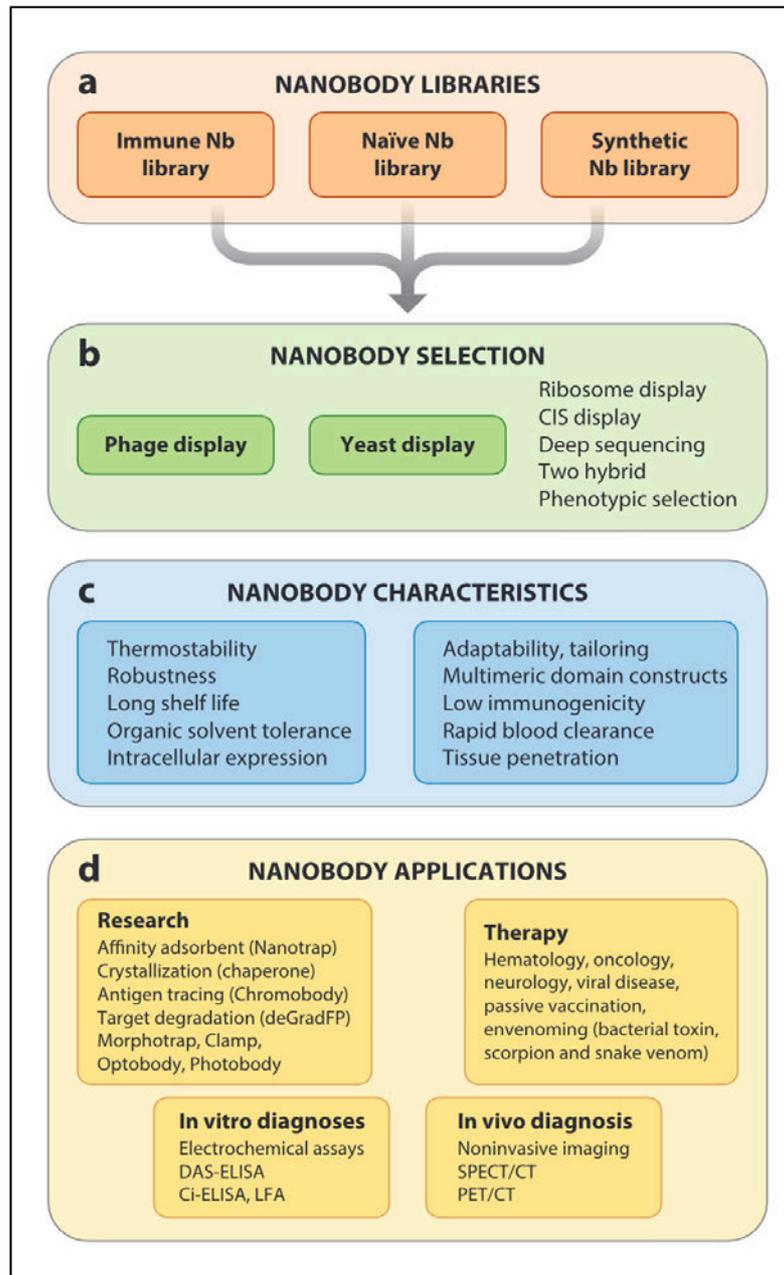


Figure 17 : Résumé des méthodes de génération des VHH, de leurs propriétés et applications. Le criblage de banques d'ADN (A) grâce à différentes méthodes de sélection (B) génère des VHH spécifiques dont les caractéristiques (C) permettent des applications variées (D).

3) La facilité d'ingénierie des VHH permet la génération de formats d'anticorps innovants

Les techniques de biologie moléculaire pour la production de protéines recombinantes ont permis de modifier les anticorps selon les propriétés recherchées, menant à la création d'une multitude de formats d'anticorps multivalent, associant plusieurs spécificités. Les briques d'assemblage de ces formats ont été à l'origine des scFv (pour single chain variable fragment),

constitués d'un VL et d'un VH associés par un lien composé d'acides aminés (Monnier et al. 2013). Par sa simplicité de structure, ce format d'anticorps a permis l'essor, dans les années 2000, de l'ingénierie d'anticorps possédant plusieurs fonctions. Le premier de ces formats approuvé dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique est le Blinatumomab®, formé par deux scFv en tandem, l'un reconnaissant l'antigène tumoral CD19 et l'autre ciblant la molécule CD3 (Burt et al. 2019) . Il permet ainsi la formation d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T exprimant CD3 à sa surface et une cellule tumorale exprimant CD19, entraînant l'activation et la redirection de la fonction cytolytique de la cellule T indépendamment de sa spécificité antigénique initiale. Les scFv sont plus petits, plus faciles à mettre au point et à produire que les IgG conventionnels et ont longtemps été considérés comme le plus petit format d'anticorps jusqu'à la découverte des VHH à la fin des années 80. Les VHH, plus stables et plus simple à modifier par biologie moléculaire sont particulièrement facile à utiliser comme « brique de construction » d'anticorps multifonctionnels (Asaadi et al. 2021). De nombreuses approches thérapeutiques et diagnostiques dans le domaine de l'immuno-oncologie utilisent cette propriété particulièrement intéressante des VHH, pour créer de nouveau formats d'anticorps. Dans cette partie nous présenterons plusieurs de ces formats, dont certains sont illustrés sur la Figure 18 (adaptée de Chames et al. 2019).

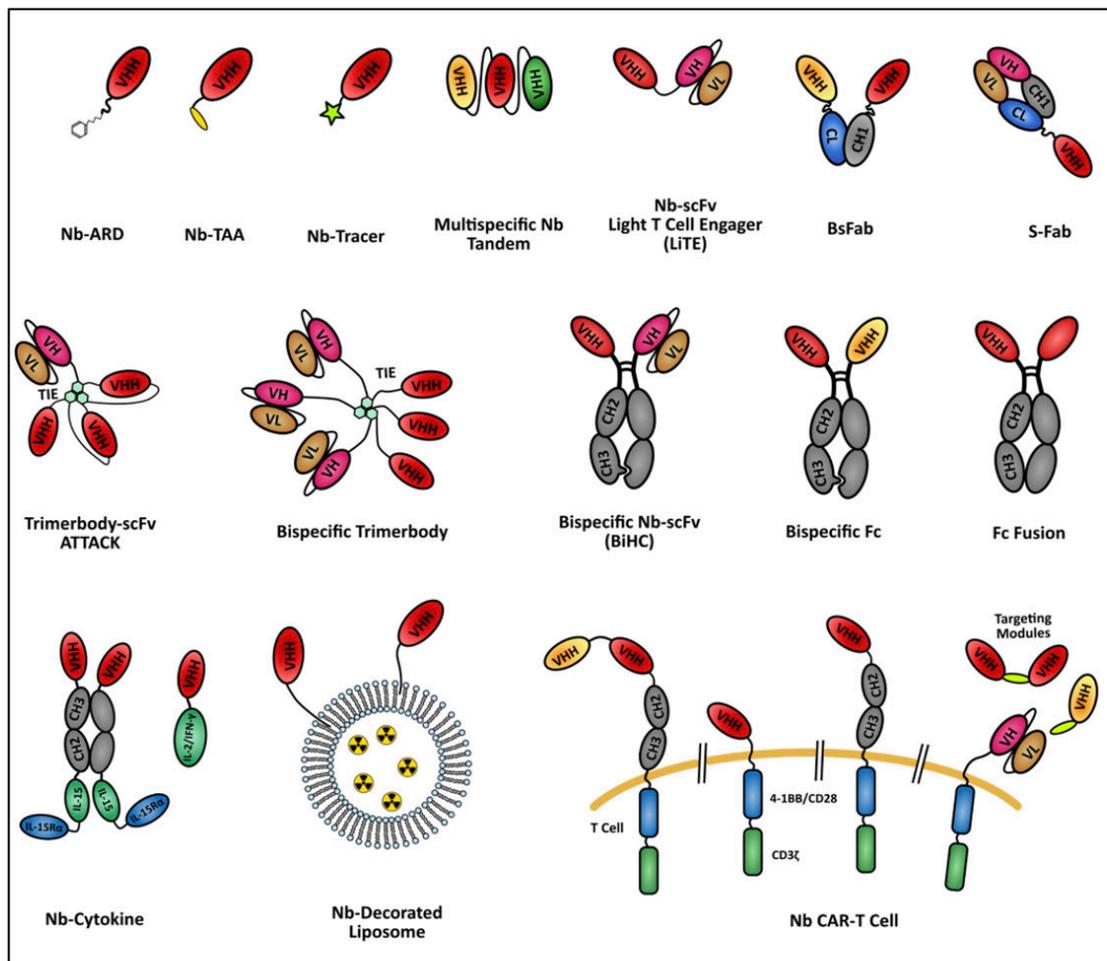


Figure 18 : Exemples de formats d'anticorps à partir de VHH étudiés en immunothérapie et imagerie

a. La génération d'immunotoxines ou de conjugués anticorps-médicaments

De nombreux anticorps conventionnels couplés à des composés cytotoxiques ont été testés en essais cliniques, cependant la taille des IgG alourdis par ces composés constitue un désavantage majeur. Le VHH est un très bon outil pour la génération d'immunotoxines. Ces molécules sont composées du VHH permettant l'adressage à la cible, par exemple un AAT, et d'une molécule toxique permettant l'élimination de la cellule exprimant l'antigène ciblé. Pour cela, les protéines toxiques telles que l'exotoxine des bactéries *Pseudomonas* (PE38), la toxine de la diphtérie ou la ricine sont fusionnés par biologie moléculaire à l'extrémité C ou N terminale du VHH (Behdani et al. 2013). Par exemple, un VHH-PE38 contre le VEGFR a été généré et permet *in vitro* d'inhiber spécifiquement la prolifération des cellules exprimant ce récepteur. Un des inconvénients majeurs de ces approches est la forte immunogénicité des toxines, empêchant le plus souvent l'injection répétée en intraveineuse du composé.

Ensuite, l'utilisation de cytokines antitumorales a été une des premières approches en immunothérapie. L'IL-2, une cytokine pro-inflammatoire qui soutient la prolifération et les fonctions des lymphocytes T, présente des propriétés antitumorales notamment dans des mélanomes et cancer du rein. L'administration de cette cytokine a été la première immunothérapie mise sur le marché en 1992 (Rosenberg 2014). Cependant, les effets secondaires lourds liés à la suractivation du système immunitaire après l'injection par voie intraveineuse, ont limité l'utilisation de cette thérapie. Les VHH couplés à des cytokines permettent de contourner ce souci. Par exemple, un VHH anti-PD-L1 couplé à l'IL-2 ou l'INF γ permettent d'adresser spécifiquement des cytokines dans des modèles de mélanomes et tumeurs de pancréas chez des souris, permettant ainsi de restreindre leur fonctions activatrices du système immunitaire au micro-environnement tumoral (Dougan et al. 2018).

b. La génération de formats d'anticorps multifonctionnels

La petite taille des VHH (15 kDa) permet de les utiliser comme des briques de construction pour générer des formats multimériques qui conservent un poids moléculaire faible et une structure protéique simple. Les VHH peuvent être fusionnés entre eux par des liens d'acides aminés, comme des répétitions d'alanine ou de glycine-sérine. De cette façon, il est possible de concevoir des formats d'anticorps multi-spécifiques par l'association de VHH ayant des cibles et des fonctionnalités différentes.

Les adaptateurs cellulaires, des anticorps bispécifiques ciblant à la fois une cellule immunitaire et une cellule tumorale, sont des stratégies prometteuses permettant d'induire une réponse immunitaire comme la cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC) ou la phagocytose des cellules tumorales exprimant l'antigène ciblé. L'association en tandem de VHH permet la génération d'anticorps dits "engagers", ciblant à la fois un antigène tumoral et un antigène effecteur du système immunitaire, sur le modèle des formats BiTE (Bispecific T Cell Engager, en anglais), formé de deux scFv en tandem, comme l'anticorps blinatumab cité précédemment et qui redirige la réponse T vers les cellules tumorales (Burt et al. 2019). Des stratégies sont également étudiées pour activer d'autres types de cellules immunitaires. Des VHH anti-CD16 (Fc γ RIII), récepteur activateur exprimé par les cellules NK ainsi que les macrophages, ont été associés en tandem à un VHH anti-CEA (pour carcinoembryonic antigen, en anglais) (Dong et al. 2016). Cette construction permet ainsi de rediriger via le VHH anti-CD16 la cytolyse des NK et la phagocytose des macrophages contre les cellules reconnues par le VHH anti-CEA. Les

auteurs ont observé une forte cytotoxicité des NK contre les cellules tumorales *in vitro*, qui entraîne l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* confirmant l'intérêt et l'apport des VHH dans ce type d'approche antitumorale.

Les cellules CAR-T, pour Chimeric Antigen Receptor, sont des cellules T modifiées pour exprimer un récepteur TCR chimérique dont l'activation est indépendante de la présentation de peptides par les CMH de classe I mais liée à un paratope dérivé d'un anticorps fusionné à la chaîne du TCR (Gross et al. 1989) (Styczyński 2020). Brièvement, le CAR permet la redirection de la fonction de l'effecteur immunitaire l'exprimant contre une cible antigénique reconnue par un paratope spécifique. Ce type de thérapie permet ainsi la lyse directe de cellules tumorales par les cellules CAR-T (Titov et al. 2020). Kymriah®, la première thérapie CAR-T approuvée, a montré son efficacité dans le traitement de leucémies lymphoblastiques aiguës. La région de reconnaissance de ce récepteur chimérique est composée d'un scFv spécifique de l'antigène CD19. Les VHH peuvent également être utilisés dans le cadre de ces thérapies, sous format mono ou bi-spécifique. Un CAR bivalent basé sur un VHH anti-EGFR permet de cibler avec plus d'efficacité les cellules exprimant faiblement l'EGFR par rapport à un CAR monovalent. Afin de surmonter le problème de perte d'expression de l'antigène ciblé dans les thérapies CAR, un récepteur bi-spécifique composé d'un VHH anti-HER2 en tandem avec un VHH anti-CD20 a été généré. L'incubation de ces cellules CAR T bi-spécifiques avec des cellules Jurkat surexprimant les deux antigènes entraîne leur activation et la production de cytokines antitumorales (de Munter et al. 2018).

c. Augmenter la demi-vie des VHH pour des applications thérapeutiques

La courte demi-vie des VHH, liée à leur faible poids moléculaire, est un désavantage en thérapie (Kijanka et al. 2015). En effet, comme vu précédemment, la diffusion des anticorps dans les tissus est augmentée par leur temps de présence systémique. La faible demi-vie du format VHH monomérique limite donc sa capacité à cibler un antigène intratumoral. Afin de contourner cette limitation, plusieurs stratégies peuvent être employées, dont le principe consiste à fusionner le VHH spécifique de la cible à une autre molécule, afin d'augmenter son poids moléculaire, ou de lui conférer les propriétés d'une molécule possédant une demi-vie plus longue. Une première approche consiste à associer un VHH à des composés Polyéthylène Glycol (PEG). En thérapie, cette solution est cependant limitée par la réponse immunitaire forte

développée contre le PEG à la suite de des injections répétées (Hoogenboezem and Duvall 2018).

Une deuxième approche consiste à utiliser l'albumine, la protéine la plus abondante dans le sang, comme molécule porteuse (en anglais, « carrier »). En effet, coupler la molécule anticancéreuse à cette protéine permet d'augmenter l'efficacité de la thérapie par deux mécanismes. Premièrement, l'albumine a une demi-vie particulièrement longue de 19 jours chez l'Homme, ce qui permet la circulation du composé actif pendant un long moment dans le sang (Sleep et al. 2013). Deuxièmement, elle permet d'augmenter la pénétration du composé dans les tumeurs solides. En effet, la néovascularisation tumorale aboutit à la mise en place de vaisseaux poreux et à l'accumulation de sang dans les tissus tumoraux. De plus, l'albumine traverse naturellement l'endothélium vasculaire par transcytose, médiée par sa fixation au récepteur GP 60. L'intérêt pour une application thérapeutique est donc que la molécule active couplée à l'albumine adopterait ses propriétés de bio distribution. Cette approche est particulièrement adaptée aux VHH, car il est possible de mettre au point un VHH bivalent composé du VHH spécifique de la cible thérapeutique fusionné à un VHH anti-albumine (Tijink et al. 2008). Une étude a montré dans un modèle de souris porteuses de tumeurs A431, une meilleure capacité de pénétration tumorale d'un VHH trivalent anti-EGFR (x2) -anti-Albumine en comparaison de son équivalent anti-EGFR (x2) (Tijink et al, 2008). Les essais pré-cliniques d'un VHH anti-récepteur de l'IL-6 fusionné à un anti-albumine, généré par l'entreprise Ablynx, sont très prometteurs sur ce plan. La demi-vie du VHH anti-IL6R fusionné au VHH-anti albumine chez le singe cynomolgus a été augmentée de 30mn à 6,6 jours, et ce malgré son faible poids moléculaire de 26 kDa (van Roy et al. 2015).

Une troisième approche consiste à fusionner un VHH avec la région Fc d'une IgG. Cette stratégie permet également l'addition d'une fonction cytotoxique au VHH. Ce format de VHH dimérique ressemble alors d'avantage à une IgG classique mais de poids moléculaire inférieur (environ 90 kDa au lieu de 150 kDa) tout en étant supérieur à la limite d'exclusion de la clearance rénale. Une étude a parfaitement démontré l'efficacité de cette approche et son application directe en cancérologie (Bell et al. 2010). Un VHH ciblant l'EGFR a été obtenu par immunisation d'un lama et identifié à la suite du criblage par phage display. Le VHH d'intérêt a ensuite été multimérisé soit par fusion avec une sous unité de la toxine B de Shiga mutée, formant des pentamères de VHH de 126 kDa, soit par fusion avec une région Fc d'un IgG. Le format

d'anticorps VHH-Fc possède la demi-vie la plus longue : 4 jours après l'injection, 10% de la dose initiale sont encore présents, tandis que la majorité des deux autres formats ont été éliminés après 1h pour le VHH et 4h pour le pentamère. Malgré le poids moléculaire élevé de ce dernier format, on peut penser que la protéine est dégradée par des enzymes de clivage, par réaction immunitaire contre la toxine de Shiga, ou bien encore que la présence d'une région Fc qui interagit avec les récepteurs FcRn des cellules endothéliales est un facteur majeur d'augmentation de la demi-vie. Une autre étude par (Godakova et al. 2019) sur la pharmacocinétique ainsi que l'efficacité protectrice *in vivo* d'un VHH, VHH-dimère ou VHH-Fc bloquant la neurotoxine Botulique a confirmé ces résultats. L'efficacité de protection du VHH-Fc augmente drastiquement de plus de 1000 fois par rapport aux deux autres formats, et ceci grâce à sa demi-vie augmentée. En effet, 10% de la dose initiale de VHH-Fc est encore présente dans le sang 4 jours après injection, et 1% après 14 jours. Tandis que 90% de la dose de VHH monomérique ou dimérique ont été éliminés 1h seulement après l'injection, ce qui diminue fortement leur capacité protectrice dans le temps. Pour certaines applications thérapeutiques, l'absence de fragment Fc sur les VHH est un inconvénient. En effet, la région Fc permet le recrutement des cellules du système immunitaire inné, et c'est par cette fonction que certaines thérapies ciblées sont efficaces. Cette dernière méthode permet donc de contourner les deux inconvénients majeurs en thérapie du format parental des VHH, à savoir la courte demi-vie et l'absence de fonction effectrice, tout en maintenant le poids moléculaire de la molécule inférieur à celui d'une IgG conventionnelle.

4) Des VHH bloquant des points de contrôle immunitaires

Les propriétés de meilleure pénétration tumorale des VHH a convaincu de nombreux groupes de les utiliser comme anticorps bloquant des points de contrôles immunitaires dans les tumeurs solides. Des VHH antagonistes de récepteurs déjà ciblés comme immunothérapie antitumorale ont été obtenus. Un VHH-Fc anti PD-L1 a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en Chine sous le nom Envafolelimab®, pour injections sous cutanée dans le traitement de certains cancers solides (Chen et al. 2022). La structure du complexe formé par ce VHH et PD-L1 a permis de déterminer qu'il entre en compétition directe avec PD-1 par sa fixation à un épitope proche sur PD-L1 (Zhang et al. 2017).

Des VHH contre de nouveaux points de contrôles immunitaires qui ne sont pas encore ciblés dans des thérapies approuvées sont également à l'étude. Un VHH anti TIM-3 a montré des résultats encourageants *in vitro*, avec un effet anti prolifératif sur des lignées de leucémie humaine HL-60 (Yu et al. 2021) (Homayouni et al. 2016). Cependant, les auteurs n'ont pas observé de différence de capacité de pénétration des tissus entre le VHH et les anticorps conventionnels anti-TIM-3.

CD47 est une molécule du soi qui protège les cellules de la phagocytose en se liant au récepteur SIRP- α exprimé par les macrophages (Jiang et al. 2021). Cette fonction est détournée par certaines cellules tumorales qui surexpriment le ligand. Afin de bloquer cet axe d'échappement au système immunitaire, des anticorps anti-CD47 ont été développés. Cependant une telle thérapie entraîne une forte toxicité due à l'expression ubiquitaire de CD47. Un modèle de souris porteuses de cellules de mélanome B16F10 modifiées génétiquement pour exprimer un VHH anti-CD47, a permis de contourner à la fois ce problème de toxicité et le désavantage de la faible demi-vie du VHH monomérique en adressant spécifiquement le VHH dans le microenvironnement tumoral (Ingram et al, 2017).

Pour conclure, les propriétés uniques des VHH liées à leur petite taille, leur facilité de production, leur stabilité en font des formats d'anticorps très pertinents pour de nombreuses applications. La diversité des formats de VHH actuellement en essais cliniques et présentés en Figure 19 (adaptée de Muyltermans, 2021) montre bien le réel atout de l'ingénierie des VHH pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. En 2019, soit moins de 30 ans après leur découverte, un VHH était approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et 27 autres étaient en études cliniques (Asaadi et al. 2021).

Name(s)	Format	Target(s)	Disease	Phase	Sponsor(s)
Caplacizumab, Cablivi ALX0081, ALX0681	Bivalent, monospecific	Von Willebrand Factor-A	Acquired thrombotic thrombocytopenia purpura	3	Ablynx (Sanofi)
ALX0141	Trivalent, bispecific	RANKL-HSA- RANKL	Osteoporosis	1	Ablynx
Vobarilizumab, ALX0061	Bivalent, bispecific	IL6R	Rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus	2	Ablynx, Abbvie
ALX0651	Biparatopic, monospecific	CXCR4	Multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma	1	Ablynx
Ozoralizumab, ATN103 (ATN192 = pegylated ATN103)	Trivalent, bispecific	TNF α -HSA- TNF α	Rheumatoid arthritis	2	Ablynx, Taisho
ALX0171	Trivalent, monospecific	RSV	Lower respiratory tract infection	1	Ablynx
2Rs15d	Monomeric, iodinated (¹³¹ I)	HER2	Breast cancer	1	Camel-IDS
TAS266	Tetramer	Death receptor-5	Advanced solid tumors	1	Novartis Pharmaceuticals
NbBI.1031020	Biparatopic	A β	Alzheimer's disease	1	Boehringer Ingelheim
BCMA Nb CAR-T	CAR-T	BCMA	Multiple myeloma	1	Henan Cancer Hospital, Pregene
Bispecific Nb-derived CAR-T	CAR-T	CD19/CD20	B-cell lymphoma	1	Henan Cancer Hospital
ARP-1, VHH2013027	Monomeric	Rotavirus	Rotaviral diarrhea	2	International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Unilever
MSB0010841, M1095, ALX0761	Trivalent, monospecific	IL17A-IL17F- IL17A/F	Psoriasis	2	Merck KGaA, Bond Avillion 2 Development LP
M6495	Bifunctional	ADAMTS-5	Knee osteoarthritis	1b	Merck KGaA
Lulizumab, BMS931699	Monomeric, pegylated	CD28-B7	Systemic lupus erythematosus	2	Bristol-Myers Squibb
LMN-101	Monomeric	FLaA flagellin of <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> infection	1	Lumen Bioscience

Figure 19 : La diversité des formats VHH actuellement en essais cliniques

Les objectifs de l'étude

Ce projet de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration en convention Cifre entre l'entreprise Invectys, qui développe des immunothérapies anti-cancéreuses principalement axées sur la molécule HLA-G et ses récepteurs, et la Plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur, experte dans la génération et le design de VHH.

Comme discuté au cours de cette introduction, les VHH présentent des intérêts majeurs par rapport aux anticorps conventionnels, par leur facilité de production à un faible coût, leurs caractéristiques biophysiques et biochimiques. L'amélioration de l'efficacité des immunothérapies bloquant des points de contrôle immunitaires nécessite le développement de nouvelles molécules ciblant plusieurs de ces points de contrôles. L'ILT4 est un récepteur inhibiteur du système immunitaire récemment décrit comme un nouveau point de contrôle immunitaire et comme une cible potentielle en immunothérapie antitumorale.

Cette thèse a donc eu pour but de développer de nouveaux formats d'anticorps VHH antagonistes d'ILT4 et de démontrer leur applicabilité en immunothérapie.

Pour cela, mes travaux de thèse ont visé à :

- Caractériser les VHH anti-ILT4 obtenus à partir d'une banque immunologique, pour leur affinité et leur spécificité pour le récepteur,
- Développer un format d'anticorps VHH antagoniste d'ILT4, capable d'inhiber l'interaction avec ses deux ligands principaux HLA-G et ANGPTL2,
- Valider l'effet biologique du VHH *in vitro* sur des modèles cellulaires de reprogrammation de macrophages pro tumoraux et sur des lignées tumorales,
- Caractériser le mode d'inhibition de ce VHH antagoniste,
- Développer un modèle de souris transgéniques pour l'étude *in vivo* de l'efficacité antitumorale du VHH anti-ILT4.

Résultats

Les résultats présentés font actuellement l'objet de la rédaction d'un article scientifique.

I. Développement d'un VHH antagoniste d'ILT4 capable d'inhiber *in vitro* la polarisation de macrophages en phénotype M2 pro-tumoral

1) Caractérisation des VHH anti-ILT4

Le projet de génération d'un VHH anti-ILT4 a été initié en 2018 par l'entreprise Invectys en collaboration avec la Plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur. A mon arrivée au laboratoire, les étapes d'immunisation d'un alpaga et de criblage de la banque immunologique réalisées par le Dr. Gabriel Aymé, avaient permis de sélectionner 15 clones reconnaissant ILT4. L'analyse des séquences de ces anticorps a permis de distinguer deux familles sur la base d'homologies entre les séquences protéiques du CDR3, domaine des VHH assurant la reconnaissance et la spécificité pour l'antigène : une famille autour du clone C9, une autre autour du clone A2 et 7 clones uniques différents les uns des autres (Figure 20).

Préalablement à mon intégration dans le laboratoire, des résultats préliminaires de compétition réalisés par Invectys ont permis de sélectionner 6 VHH démontrant une capacité de blocage pour l'interaction entre ILT4 et ses deux ligands principaux HLA-G et l'ANGPTL2 (données non montrées). Cependant, ces données étant préliminaires, mes premières études expérimentales se sont donc concentrées sur la caractérisation de ces 6 VHH.

Groupe 1	VHH-A2.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASAVTSRPYYIGWIRQSPGKERETISCIESRGGSTNYADS	
	VHH-D7	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTSRPYYIGWFRQSPGKEREGVSCISSREGSTNYADS	
	VHH-C9.2	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTSRHYYIGWFRQSPGKEREGVSCISSREGSTNYADS	
	VHH-E7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSRHYYIGWFRQAPGKEREGVSCITSREGSTNYADS	
	VHH-C7.3	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTSRHYYIGWFRQSPGKEREAISCISSREGSTSYSDS	
VHH-G3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRHYYIGWFRQSPGKEREGVSCISSREGSTNYADS		
Groupe 2	VHH-A2	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVNAYHIGWFRQAPGKEREGVSVFISS-DHSTNYADS	
	VHH-F5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVNAYHIGWFRQAPGEEREGVSVFISS-DRETNYADS	
Séquences uniques	VHH-G10	QVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFFAYTMGWFRQAPGKEREVLSGIDWTGSSSNYADS	
	VHH-C9.1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTLNGYTTGWFRQAPGKEREFVATIRAIDGSTSYADS	
	VHH-C7	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVALEHYSIGWFRQAPGKEREGVSCISNSGHTTKYADS	
	VHH-D8.3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEDYAMAWFRQAPGKEREGVSCISNSNDKTYADS	
	VHH-B8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTLDYYAISWFRAPGKEREGVSCIGNSGDSTNYADS	
	VHH-D12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDHYAIGWFRQAPGKEREGVSCINVNRGTSAYADS	
VHH-H12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDSYAVGWFRQAPGKEREGVSCISSGGSTHYADS		
Groupe 1	VHH-A2.1	LRDRFTISRDNQNMFFYLQMNLSKSEDTAIYYCAARYSSCSGTPSDYEWGQGTQVTVSS	CDR1
	VHH-D7	VKDRFTISRDNQSMFFYLQMNLSKSEDTAVYYCAGRYSTCSGMARDYNYWGQGTQVTVSS	CDR2
	VHH-C9.2	VKDRFTISRDNQNMFFYLQMNLSKSEDTAVYYCAARYSSCSGFARDYAWGQGTQVTVSS	CDR3
	VHH-E7	VKDRFTISRDNQNMFFYLQMNLSKSEDTAVYYCAARYSSCSGMPSDYNYWGRGTQVTVSS	
	VHH-C7.3	VKGRFTISRDNQNMFFYLQIDSLSESDTAVYFCAARYSSCSGMARDYNYWGRGTQVTVSS	
VHH-G3	VQDRFTISRDNQNMFFYLQMNLSKSEDTAVYYCAGRYSSCSGMPRDYNYWGRGTQVTVSS		
Groupe 2	VHH-A2	VKGRFTISRDS--GTVYLQMNRLKPEDTATYYCAATANQLWQVVMGITSWGQGTQVTVSS	
	VHH-F5	VKGRFTISRDSAKNTVYLQMNRLKPEDTAVYYCAATANQLWRLWVGISSWGQGTQVTVSS	
Séquences uniques	VHH-G10	VRGRFTISRHNAKNTLYLQMNLSKPDPTAVYYCATLCSLLLRVARPIADGGVWSQVTQVTVSS	
	VHH-C9.1	VMGRFTISRDNKNTLYLEMNRLKPEDSALYYCAARLRVSNNGNAWSSSYLHWGRGTQVTVSS	
	VHH-C7	VKGRFTVSRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAATPRGWGLTSNQYEWGQGTQVTVSS	
	VHH-D8.3	VKGRFTISRDNKNTVHLQMNRLKLEDTAVYYCAALIDCIAFGSKEVILGQGTQVTVSS	
	VHH-B8	VKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEETAVYYCAARKGFASSCHGLGAAYDSYDYESLYDYWGQGTQVTVSS	
	VHH-D12	VKGRFTISRDNKNTVYLQMDNLRPEDTAVYYCAALLEGASGDVDDVNQNYGMDYWGKGLTVTVSS	
VHH-H12	VKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTASYC AALREGSYYPDDDACRDMYWGKGTQVTVSS		

Figure 20 : Classification des VHH anti-ILT4 par homologie de séquence protéique

Les 15 VHH sont classés selon l'homologie de séquence protéique de la région CDR3, en deux familles de clones proches et 7 séquences uniques.

L'affinité de ces 6 VHH pour ILT4 a été mesurée par Interférométrie Bio-couche (en anglais Biolayer Interferometry). Ces mesures nous ont permis d'estimer l'affinité des VHH via le calcul de la constante de dissociation à l'équilibre, ou K_D . Cette valeur correspondant au ratio K_{off}/K_{on} détermine la cinétique d'association et de dissociation entre l'anticorps et son antigène, et est exprimée en molaire. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps nécessaire pour l'interaction avec le ligand. En d'autres termes, plus la valeur du K_D est faible, plus l'affinité de l'anticorps pour sa cible est grande. L'affinité des anticorps de manière générale se situe entre le micromolaire (μM) et le picomolaire (pM), avec une majorité des anticorps ayant une affinité de l'ordre du nanomolaire (nM).

Comme on peut l'observer dans le tableau de la Figure 21 A, les 6 VHH présentent une très forte affinité pour ILT4, avec des K_D de l'ordre du nM pour les VHH C7 et H12. L'affinité des autres VHH A2, B8, C9 et D7 est inférieure au seuil de détection de la méthode et elle est estimée être de l'ordre du pM (les courbes de Kon et Koff sont présentées en résultat annexe 6). Une analyse par résonance plasmonique de surface (SPR), une méthode de mesure d'affinité plus sensible, pourra être réalisée par la suite pour confirmer avec plus de précision ces données.

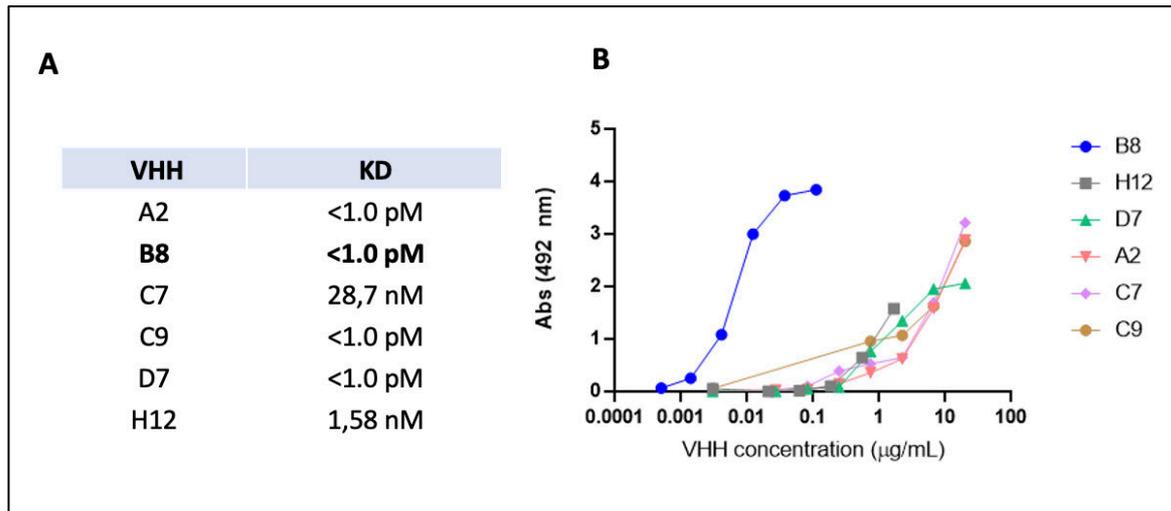


Figure 21 : Caractérisation de l'affinité des VHH pour ILT4

- A. **Mesure d'affinité des VHH pour ILT4.** Mesure d'affinité par Interférométrie Bio-couche (Octet HTX)
- B. **Courbes de fixation des six VHH sur l'ILT4.** (ELISA indirect) L'ILT4-hFc est immobilisé au fond du puits et incubé avec des concentrations croissantes de VHH. La présence des VHH fixés à ILT4-hFc est détectée par un anticorps anti- HisTag couplé à la HRP.

Dans un test de fixation réalisé en ELISA, Le VHH B8 se distingue fortement des cinq autres par son profil de fixation sur le récepteur ILT4 (Figure 21 B). En effet, les quatre VHH H12, A2, C7 et C9 ne saturent pas le récepteur même à une forte concentration de 20 µg/mL. Le VHH D7 arrive à saturation pour une concentration de 10 µg/mL. La EC50, c'est à dire la concentration efficace médiane (half maximum effective concentration, en anglais) est une valeur qui permet de comparer l'efficacité de différentes molécules entre elles. Il s'agit ici de la concentration à laquelle on observe 50% du signal correspondant à la fixation sur ILT4. Le VHH B8 a une efficacité de fixation bien supérieure aux autres VHH. Son EC50 est estimé à 0.01 µg/mL, soit 100 fois plus faible que celle du VHH D7 (1 µg/mL).

A partir de ces premiers résultats de caractérisation, fondés sur la force d'interaction entre les VHH sélectionnés et le récepteur ILT4, nous avons déterminé que le VHH B8 se distingue des autres VHH spécifiques pour ILT4 par son affinité élevée. Cependant, d'autres paramètres que l'affinité restaient à évaluer pour sélectionner le VHH présentant le potentiel le plus important pour développer notre stratégie d'immunothérapie.

Comme présenté dans l'introduction, l'ILT4 fait partie de la famille des récepteurs inhibiteurs ILT qui partagent une grande homologie. Les séquences protéiques du récepteur inhibiteur ILT2 (LILRB1) et du récepteur inhibiteur ILT4 (LILRB2) sont homologues à environ 80% (Borges and Cosman 2000). De plus, ILT4 partage également 50% d'homologie de séquence avec son homologue murin PIR-B. Nous avons donc souhaité étudier s'il existait une réactivité croisée entre les VHH anti-ILT4 générés et l'ILT2, ou PIR-B. La réactivité croisée entre nos VHH anti-ILT4 et le récepteur ILT2 aurait des conséquences sur notre stratégie thérapeutique, que nous aborderons par la suite dans la discussion. Ensuite, la réactivité croisée des VHH avec le récepteur murin PIR-B a été évaluée dans le cadre du projet de génération d'une lignée de souris transgéniques ILT4+ PIR-B- (voir la partie « Résultat annexe 5 »). Nous avons donc analysé la capacité des VHH à se lier au récepteur ILT2 (ILT2-hFc, R&D Systems) d'une part et PIR-B-6His (R&D Systems) d'autre part.

Pour cela, deux tests ELISA indirects ont été mis au point avec deux systèmes de révélation différents. Les VHH générés possèdent deux étiquettes (tags) permettant de les détecter : (i) une étiquette 6His et (ii) cMyc. Concernant l'ELISA pour le récepteur ILT2, la détection des VHH associés au récepteur a été analysée au moyen d'un anticorps anti-HisTag conjugué à l'enzyme peroxydase (HRP) puisque le récepteur recombinant ILT2-Fc n'est pas couplé à une étiquette 6His.

Cependant, la protéine PIR-B possédant, quant à elle, une étiquette 6His, la présence des VHH fixés à ce récepteur ne peut être détectée par un anticorps anti-HisTag comme précédemment. Dans ce contexte, les VHH ont donc été détectés au moyen d'un anticorps anti-cMyc-HRP. Un contrôle positif de détection des VHH fixés sur l'ILT4-hFc avec ces deux méthodes a été réalisé, ainsi qu'un contrôle de l'immobilisation (ou coating en anglais) d'ILT2-Fc et PIR-B par des anticorps spécifiques pour ILT2 et PIR-B (« control mAb » sur la Figure 22).

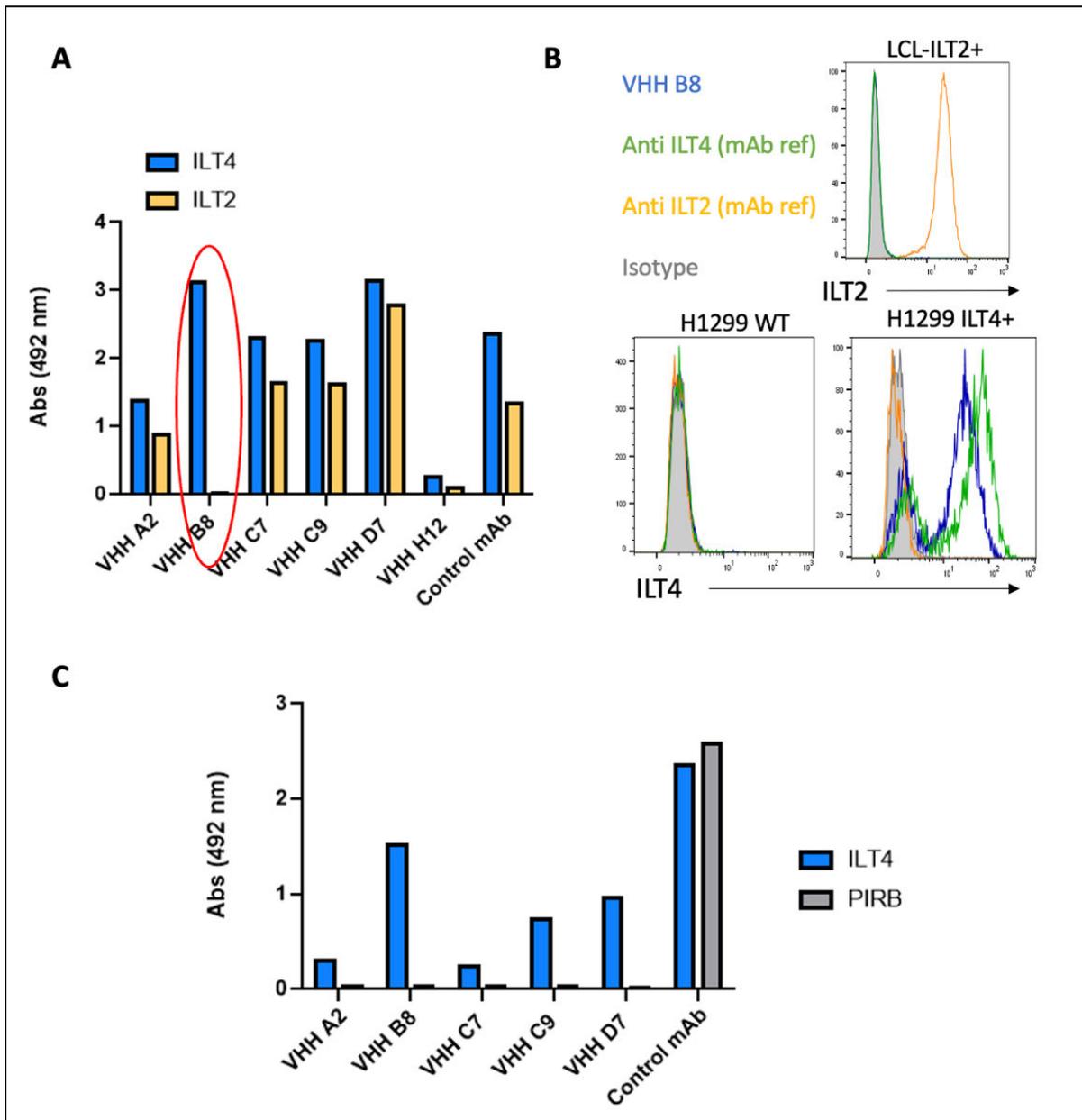


Figure 22 : Étude de la réactivité croisée des VHH pour les récepteurs ILT2 et PIR-B

- A. Reconnaissance de ILT4 et ILT2 par les VHH en ELISA indirect.** Les récepteurs sont immobilisés puis incubés avec les VHH ou les anticorps contrôles. La présence des anticorps fixés aux récepteurs est analysée par un anticorps secondaire anti-HisTag HRP. En bleu le signal obtenu dans les puits contenant ILT4 et en jaune dans ceux contenant ILT2.
- B. Fixation des VHH à ILT2 ou ILT4 à la surface de cellules.** Analyse en cytométrie en flux de la fixation du VHH B8 sur des cellules H1299-ILT4+ ou LCL-ILT2+ : en bleu la fixation du VHH B8, en vert l'anticorps anti-ILT4 de référence (42D1), en jaune l'anticorps anti-ILT2 (HP-F1) et en gris un contrôle isotypique (VHH anti- β -amyloïde).
- C. Reconnaissance de ILT4 et PIR-B par les VHH en ELISA indirect.** Les récepteurs sont immobilisés puis incubés avec les VHH ou les anticorps contrôles. La présence des anticorps fixés aux récepteurs est analysée par un anticorps secondaire anti-cMyc HRP. En bleu le signal obtenu dans les puits contenant ILT4 et en gris dans ceux contenant PIR-B.

Pour ces deux ELISA, les contrôles positifs nous permettent de valider la qualité du coating des deux antigènes. De plus, nous validons que les VHH sont bien détectés dans les puits coatés avec l'ILT4-hFc en utilisant ces deux méthodes de détection. Tous ces contrôles nous permettent de valider que l'absence de signal observé dans les puits coatés avec ILT2-Fc ou PIR-B démontre que les VHH ne reconnaissent pas ces récepteurs, et non d'un biais expérimental.

Il est intéressant de noter que parmi les six VHH testés, seul le VHH B8 ne reconnaît pas le récepteur ILT2 (Figure 22 A). Ce test nous a aussi montré que le VHH H12 n'était pas stable dans le temps, car le signal obtenu avec ce VHH sur l'ILT4 est très faible. Ce VHH sous format monomérique n'a donc pas été inclus dans les prochains tests de caractérisations. Concernant le récepteur murin PIR-B, orthologue des récepteurs ILT2 et ILT4 chez la souris, les résultats de l'ELISA démontrent qu'aucun VHH ne reconnaît ce récepteur murin (Figure 22 C).

La capacité du VHH B8 à discriminer entre les récepteurs ILT4 et ILT2 a été ensuite confirmée par cytométrie en flux (Figure 22 B). Les cellules myéloïdes exprimant à la fois le récepteur ILT2 et l'ILT4 à leur surface, il n'était pas possible d'utiliser des monocytes isolés de PBMCs pour cette caractérisation. Nous n'avons pas détecté la présence d'ILT4 dans les lignées tumorales que nous avons testées, décrites dans la littérature comme exprimant le récepteur (voir la partie « Résultat annexe 2 »). Nous avons donc développé un modèle cellulaire permettant de caractériser les différents VHH par cytométrie en flux, par transduction de cellules H1299, une lignée de cellules de carcinome de poumon humains, avec un lentivirus encodant le gène pour le récepteur ILT4 (voir la partie « Résultat annexe 2 »). A l'issue de cette transduction, 75% des cellules H1299 exprimaient l'ILT4 à leur surface, ce qui nous a permis de valider que le VHH B8 est capable de reconnaître le récepteur exprimé à la surface des cellules (Figure 22 B), avec un profil de marquage similaire à l'anticorps anti-ILT4 de référence (clone 42D1). Ce marquage est bien spécifique à l'ILT4, car aucun signal n'est observé sur les cellules H1299-Wild Type (WT) n'exprimant pas le récepteur. Afin de confirmer que le VHH B8 ne reconnaît pas le récepteur ILT2, nous avons utilisé la lignée LCL de lymphoblastes humains. Ces cellules expriment le récepteur ILT2 et n'expriment pas le récepteur ILT4, comme validé par le marquage avec l'anticorps de référence anti-ILT2 (figure 22 B) et l'absence de signal obtenu avec l'anticorps de référence anti-ILT4. L'absence de marquage par le VHH B8 sur cette lignée nous confirme donc

la spécificité de ce VHH pour le récepteur ILT4 et l'absence de réactivité croisée avec le récepteur ILT2.

En conclusion de ces deux premières parties expérimentales, à partir des tests de caractérisation de l'affinité et de la spécificité des VHH anti-ILT4 issus du criblage de la banque immunologique générée, le VHH B8 se démarque clairement des autres. En effet, ce VHH possède les propriétés les plus intéressantes : affinité très élevée et spécificité unique pour ILT4.

D'après l'alignement des séquences protéiques des VHH anti-ILT4 générés (Figure 20), on peut observer que la séquence codant pour B8 est unique et ne fait partie d'aucune famille de clones. De plus, les résultats de réactivité croisée nous indiquent qu'il est l'unique VHH à ne pas reconnaître le récepteur ILT2. On peut donc supposer que le VHH B8 reconnaît un épitope différent des autres VHH, probablement dans une région moins immunogène et non conservée entre les récepteurs ILT4 et ILT2. Cependant, l'analyse génétique des séquences (Tableau 2) nous indique que la séquence du VHH B8 provient de l'association des mêmes segments IGHV et IGHJ que les clones C7 et D7, soulignant l'importance des modifications génétiques dues aux réarrangements de ces segments et à l'hypermutation somatique dans la génération de la diversité du répertoire des lymphocytes B.

VHH	Élément V	Élément D	Élément J
A2	IGHV3S65*01 F	Non déterminé	IGHJ6*01 F
B8	IGHV3S65*01 F	Non déterminé	IGHJ4*01 F
C7	IGHV3S65*01 F	Non déterminé	IGHJ4*01 F
C9	IGHV3S58*01 F	Non déterminé	IGHJ4*01 F
D7	IGHV3S65*01 F	Non déterminé	IGHJ4*01 F
H12	IGHV3S65*01 F	Non déterminé	IGHJ7*01 F

Tableau 2 : Alignement des séquences des VHH avec les gènes V D J d'alpaga (*Vicugna pacos*, base de données IMGT)

2) Étude de la conséquence de la dimérisation des VHH sur leur fonctionnalité

Comme étudié dans l'introduction, la faible demi-vie des VHH *in vivo* est un inconvénient dans le cadre d'une thérapie antitumorale, et il est nécessaire de développer des optimisations pour accroître cette demi-vie. Nous avons choisi dans un premier temps deux stratégies : (i) la fusion des VHH avec une région Fc d'IgG, et (ii) l'homodimérisation par l'ajout d'un lien flexible glycine-serine (Gly₄Ser)₃ entre deux VHH identiques. Les structures obtenues sont illustrées sur la Figure 23 A. Les VHH ont été fusionnés à la région Fc d'un IgG1 humain ou d'un IgG2c murin. Nous ferons référence à ces constructions par les abréviations VHH-hFc et VHH-mFc, respectivement.

Ces deux formats de VHH dimériques ont été produits dans des cellules eucaryotes en utilisant le système Expi293™ et purifiés par chromatographie d'affinité. L'analyse du profil de migration des trois formats du VHH B8 (monomère B8, dimère B8-B8 et B8-mFc) par SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie (Figure 23 B) nous a permis de valider que les deux formats ont la taille attendue : environ 35 kDa pour le format B8-B8 et 45 kDa pour le format B8-mFc. Ces analyses étant réalisées en conditions dénaturantes et réductrices, ce poids moléculaire correspond à une seule chaîne formée par le VHH et la région Fc, la taille attendue pour la protéine B8-mFc en conditions native étant d'environ 90 kDa. On peut d'ailleurs observer sur le gel une légère bande à cette hauteur, suggérant une réduction partielle de l'échantillon.

Cette première analyse nous permet donc de valider que les protéines produites semblent avoir la structure attendue. Nous avons ensuite vérifié que la dimérisation n'engendre pas de changements dans la conformation des VHH, qui pourraient empêcher la reconnaissance de leur épitope sur l'ILT4. Pour cela, nous avons réalisé un ELISA indirect (Figure 23 C) dans lequel la présence des VHH-mFc fixés au récepteur ILT4-hFc est détectée par un anticorps anti-Fc de souris. On observe que tous les VHH-mFc reconnaissent bien l'ILT4.

Nous avons voulu évaluer si la dimérisation des VHH via le fragment Fc augmentait l'avidité pour l'ILT4. Le VHH B8 ayant une affinité pour ILT4 inférieure à la limite de détection de l'instrument Octet HTX, nous n'avons pas utilisé cette méthode pour mesurer l'affinité apparente des formats B8 dimériques. Nous avons donc utilisé les cellules H1299-ILT4⁺ pour comparer les courbes de saturation du récepteur par ces trois formats du VHH-B8. On observe sur la Figure 30 D que les deux formats dimériques présentent en effet une affinité apparente supérieure au monomère, et que leur EC50 est diminuée de plus de 10 fois, à 1 nM pour le

monomère contre environ 0.1 nM pour les formats dimériques. Cette augmentation de l'affinité apparente des formats dimériques s'explique par une augmentation de l'avidité des formats bivalents. Il est intéressant de noter que ces deux formats ont le même profil de fixation à l'ILT4 sur les cellules. La méthode de dimérisation, par fusion à un Fc ou via un linker flexible, ne semble donc pas avoir de conséquences sur ce paramètre.

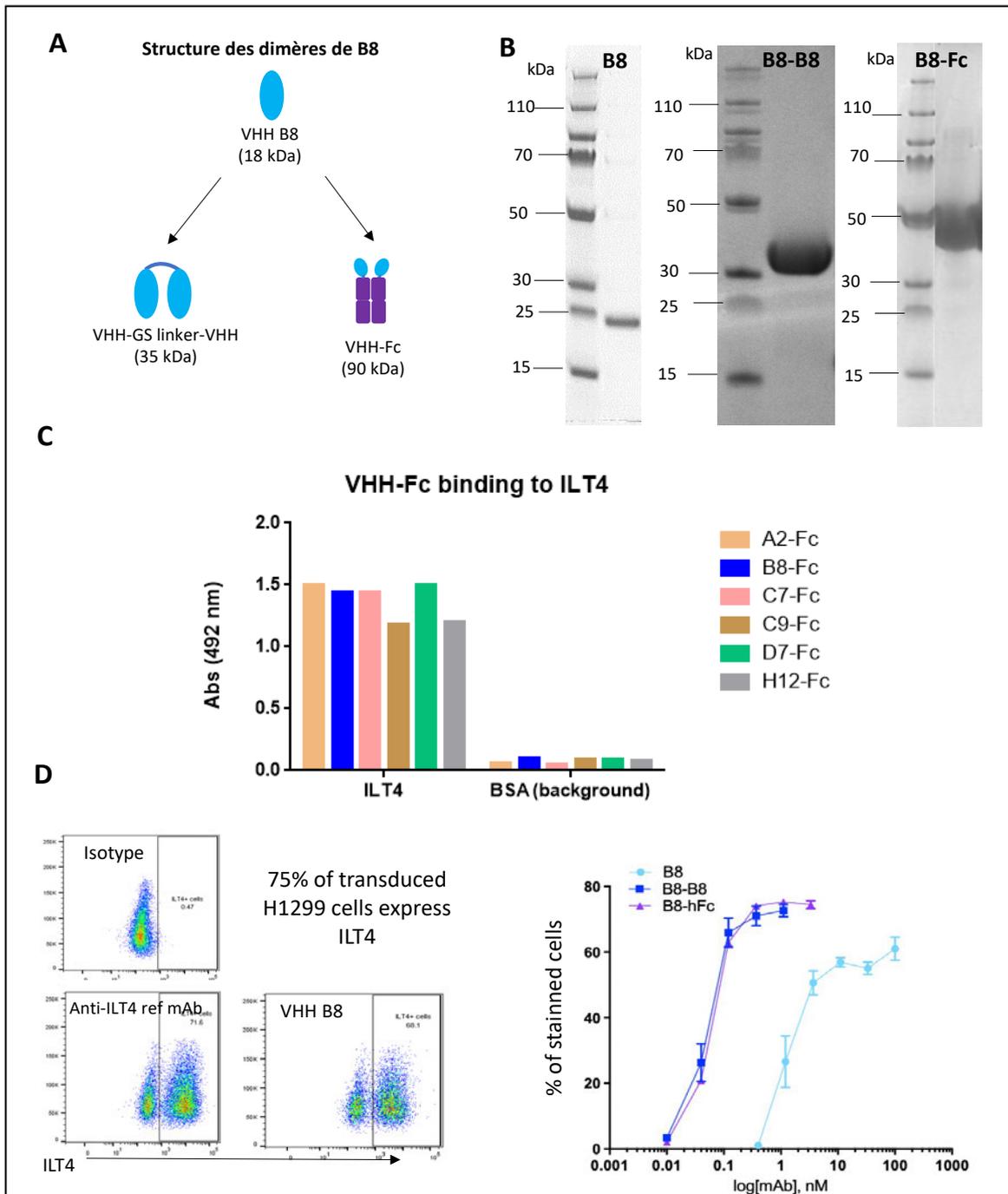


Figure 23 : Dimérisation des VHH et conséquences sur leur fixation à l'ILT4

- Présentation des structures dimériques VHH-Fc et VHH-VHH
- Analyse du poids moléculaire des trois formats du VHH B8. Migration sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices et dénaturantes, coloration en bleu de Coomassie.
- Validation de la capacité des VHH-Fc produits à reconnaître ILT4. ELISA indirect. La protéine ILT4-hFc est immobilisée puis incubée avec les VHH-mFc. La présence des VHH-mFc fixés est révélée par un anticorps anti-souris HRP.
- Comparaison des profils de fixation des trois formats du VHH B8 sur les cellules H1299-ILT4. Analyse par cytométrie en flux. A gauche, validation de l'expression d'ILT4 à la surface des cellules H1299 transduites (AcM 42D1-PE ou VHH B8-mFc-PE) et à droite, marquage des cellules avec les trois formats de B8.

3) Étude de la capacité des VHH à bloquer l'interaction entre HLA-G6 et l'ANGPTL2 avec ILT4

Pour évaluer la capacité des VHH à inhiber l'interaction entre l'ANGPTL2 et HLA-G avec le récepteur ILT4, nous avons mis au point des tests ELISA de compétition. Dans ce but, nous avons utilisé la protéine recombinante ANGPTL2 commerciale (R&D Systems). HLA-G est une protéine difficile à exprimer sous forme monomérique par des techniques de production classique de protéines recombinantes. Nous avons donc décidé de mettre au point et de développer une méthode de production de cette protéine en la fusionnant à une région Fc d'IgG2c de souris (voir la partie « Résultat annexe 1 »). L'isoforme HLA-G6, a été choisie car l'ILT4 reconnaît les isoformes non associées à la $\beta 2m$ (Kuroki et al. 2019; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al. 2006) et que la génération de cette isoforme sous format monomérique avait été préalablement réalisée au sein d'Invectys par la Dr. Maria Loustau et son équipe.

Brièvement, le principe général d'un test de compétition entre un ligand et une molécule inhibitrice pour sa cible consiste à mettre en présence une concentration fixe du ligand et du récepteur, et de faire varier la concentration de la molécule inhibitrice. Ainsi, une concentration fixe d'ILT4-hFc a été incubée avec les différents formats des VHH à des concentrations variables. Le mélange VHH/ILT4-hFc résultant a ensuite été incubé dans les puits d'ELISA préalablement coâtés avec une concentration fixe des protéines HLA-G6-mFc ou ANGPTL2. Après une étape de lavage, l'ILT4-hFc fixé aux ligands est détectée par un anticorps anti-IgG (H+L) humain. La structure du test ELISA est illustrée dans la Figure 52 de la partie Matériel et Méthodes.

La première étape de la mise en place de notre ELISA de compétition a été de déterminer la concentration d'ILT4-hFc correspondant à un état de saturation du ligand mais sans être en excès. Pour cela, nous avons établi la courbe de fixation de l'ILT4-hFc sur les deux ligands (Figure 24). La concentration optimale correspondant à cet état de saturation se situe dans la partie linéaire de la courbe, avant la saturation du signal. Nous avons donc établi les concentrations d'ILT4-hFc comme indiqué sur les graphes de la Figure 24 par les lignes pointillées, à 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour ANGPTL2, et à 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour HLA-G6-mFc.

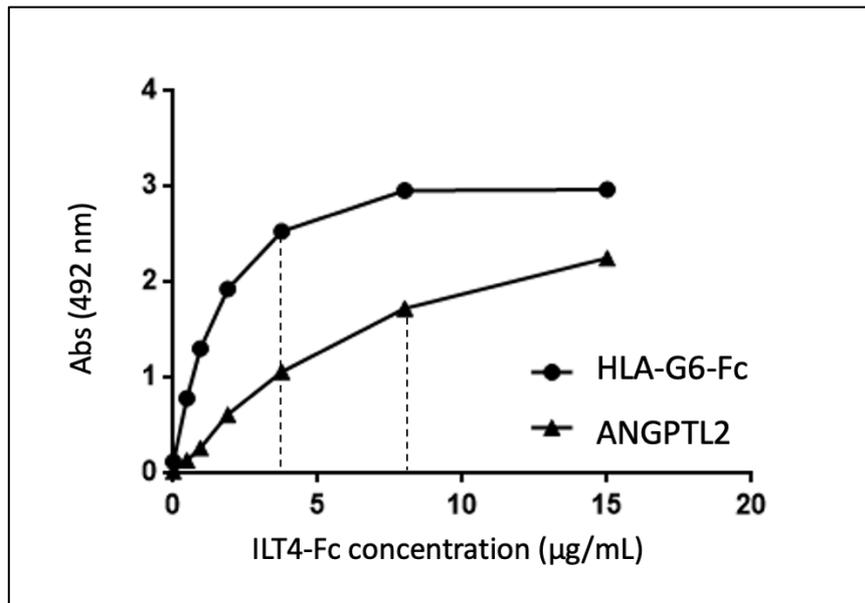


Figure 24 : Mise au point de l'ELISA de compétition.

Courbe de saturation de l'interaction entre les ligands HLA-G6-mFc ou l'ANGPTL2 avec l'ILT4-hFc. La concentration d'ILT4-hFc sélectionnée pour les deux ligands est indiquée par l'intersection entre l'axe des abscisses et les droites en pointillé.

La première étape a consisté à définir une gamme de concentration auxquelles les VHH-mFc inhibent l'interaction ILT4/ANGPTL2, et de potentiellement éliminer ceux qui ne montreraient pas une bonne capacité inhibitrice. Pour le test préliminaire, trois concentrations d'anticorps sont utilisées pour déterminer la capacité de blocage, entre 1 nM et 10 µM. Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque concentration de VHH-mFc par rapport à la valeur d'absorbance mesurée dans la condition témoin sans VHH-mFc. Les résultats obtenus lors de ce premier test (Figure 25) démontrent nettement la capacité du VHH B8-mFc à inhiber l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2. En effet, à partir de 100 nM on observe une inhibition totale de l'interaction entre le récepteur et son ligand. Parmi les autres VHH, seul le C9-mFc atteint 100% d'inhibition mais pour une très forte concentration de l'ordre de 10 µM.

Le VHH B8 se démarque de nouveau des autres, par sa capacité à inhiber fortement l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2. Ce VHH possède les propriétés les plus intéressantes, pour être le candidat de notre stratégie d'immunothérapie anti-ILT4, et nous l'avons donc sélectionné pour le développement de ce projet.

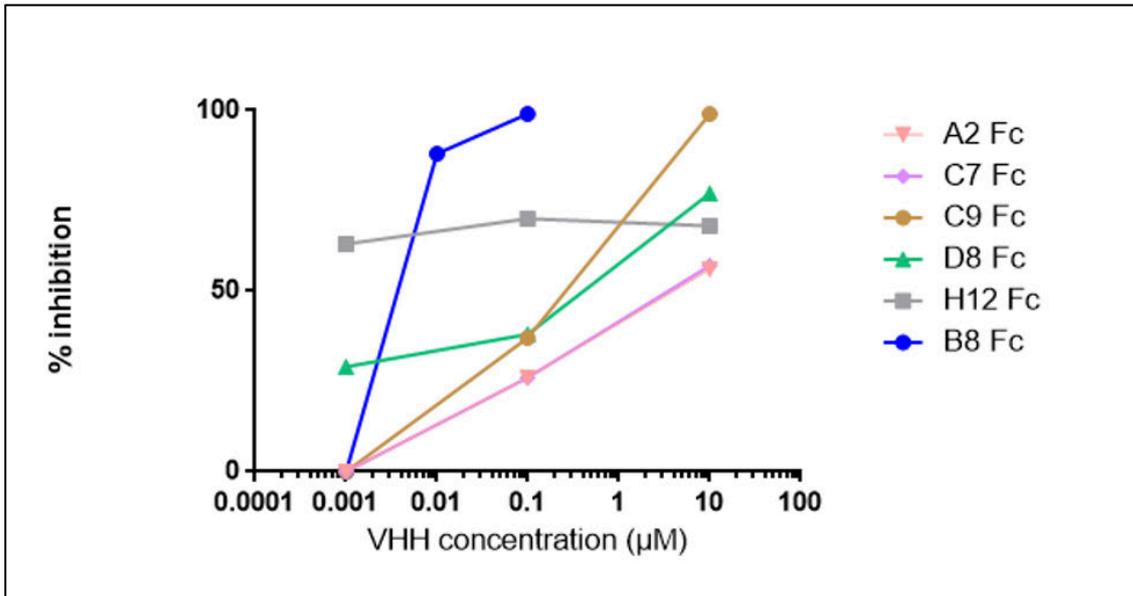


Figure 25 : Comparaison de la capacité de blocage de l'interaction entre ILT4 et ANGPTL2 par les VHH-Fc anti-ILT4. (ELISA de compétition)

Nous avons ensuite étudié si le VHH-B8 était également capable d'inhiber l'interaction entre HLA-G6-mFc et ILT4-hFc, et s'il existe une différence d'efficacité d'inhibition entre les trois formats du VHH B8 (monomère B8, dimère B8-B8 et B8-mFc), par test ELISA de compétition (Figure 26 A). Le calcul de la concentration inhibitrice médiane (Half Maximal Inhibitory Concentration ou IC50) nous permet de comparer plus précisément la capacité inhibitrice des trois formats de B8 (Tableau 3).

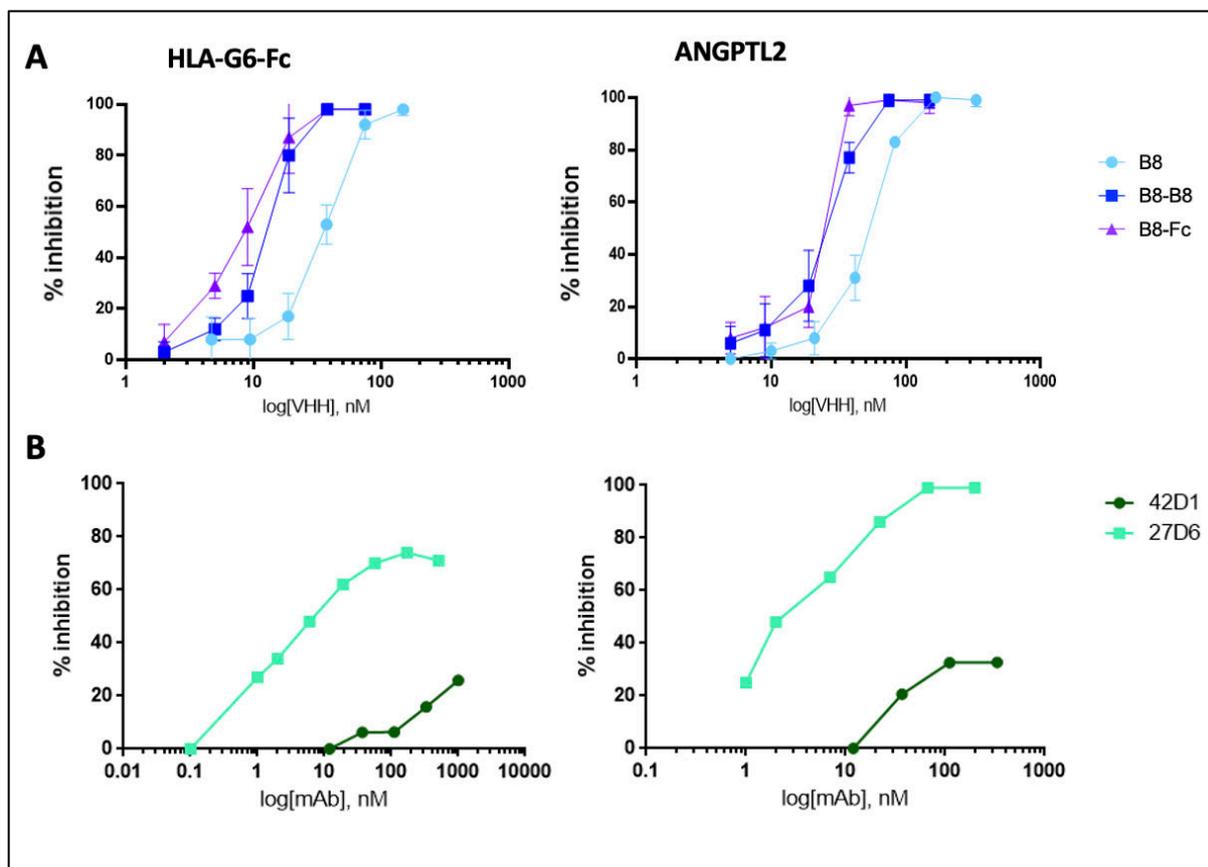


Figure 26 : Étude de la capacité d’inhibition de l’interaction entre ILT4 et ses deux ligands par les trois formats du VHH B8, et comparaison à deux anticorps anti-ILT4 de référence

- A. Comparaison des trois formats du VHH B8 à inhiber l’interaction entre les deux ligands et ILT4-hFc. ELISA de compétition. Les ligands sont immobilisés et la quantité d’ILT4-hFc fixée est mesurée en présence de concentrations croissantes de B8, B8-B8 ou B8-mFc.
- B. Comparaison de la capacité d’inhibition des anticorps anti-ILT4 de référence. ELISA de compétition. Les clones anti-ILT4 commerciaux 27D6 et 42D1 ont été testés.

Les IC50 estimées des différents anticorps sont résumées dans le tableau 3 ci-dessous :

Anticorps ou VHH	HLA-G6-mFc	ANGPTL2
VHH B8	37.5 nM	44.1 nM
B8-B8	13.4 nM	27.4 nM
B8-mFc	9.1 nM	24.9 nM
27D6 (IgM)	23.4 nM	4.4 nM

Tableau 3 : Estimation de la concentration médiane inhibitrice (IC50) des trois formats du VHH B8 et de l’anticorps 27D6. Calcul à partir d’une régression non linéaire des courbes d’inhibition obtenues par ELISA de compétition, avec le logiciel GraphPad Prism 7.

Ici afin de comparer les différents formats, nous avons exprimé l'IC50 en nM d'une molécule monomérique, dimérique ou IgM, indépendamment du nombre de site de liaison. La première observation que l'on peut faire en examinant ces valeurs d'IC50 concerne l'augmentation de la capacité de blocage des dimères de B8 (B8-B8 et B8-mFc). En effet, la concentration médiane inhibitrice de l'interaction entre ILT4 et HLA-G6-mFc est de 3 à 4 fois plus faible pour les deux formats dimériques que pour le format monomérique. Pour une inhibition à 50% de l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2, il faut une concentration du monomère B8 environ deux fois supérieure à celle des deux formats dimériques. Pour les deux ligands, les IC50 de B8-B8 et de B8-mFc sont très proches, même si légèrement inférieure pour le format Fc. Cependant il faudrait générer plus de données pour vérifier si cette différence est significative. D'après les résultats de ces premiers tests par ELISA, on peut conclure que les trois formats de B8 sont inhibiteurs de l'interaction entre ces deux ligands et ILT4, que les formats dimériques ont un profil d'inhibition similaire et qu'ils sont plus efficaces que le format monomérique.

Il a été démontré que HLA-G et l'ANGPTL2 interagissent tous deux avec les domaines extracellulaires D1-D2 de l'ILT4 (Kuroki et al. 2019; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al. 2006) (Deng et al. 2014). Puisque les différentes structures de B8 inhibent aussi bien l'interaction entre ILT4 et HLA-G que l'ANGPTL2, on peut supposer que ces deux ligands possèdent un site d'interaction très proche au niveau des domaines D1-D2 du récepteur ILT4, ou que la fixation du VHH B8 sur ces domaines encombre les 2 sites d'interaction propres à HLA-G et ANGPTL-2. Dans la deuxième partie présentant les résultats de mes travaux de thèse, je présenterai l'approche expérimentale mise en œuvre pour déterminer la nature et le site de liaison de B8 avec l'ILT4 afin de comprendre comment le VHH entre en compétition avec les deux ligands (voir partie Résultats II. Criblage de cristallogénèse du complexe VHH-B8/ILT4-ECD).

Nous avons confirmé les résultats de l'ELISA de compétition avec HLA-G6-mFc pour la fixation à l'ILT4 à la surface des cellules H1299-ILT4+. Tout d'abord nous avons observé que l'expression d'ILT4 à la surface de ces cellules n'est pas stable dans le temps, car 48% des cellules sont marquées par le VHH B8-Fc-PE (Figure 27 A), tandis que 75% de la population exprimait ILT4 à la suite de la transduction (Figure 23). Cependant, il est possible de réaliser le test de compétition avec HLA-G6-mFc en analysant uniquement cette population cellulaire ILT4+. En effet, on retrouve le même pourcentage (48%) de cellules marquées par HLA-G6-mFc (Figure 27 A, en vert). Nous avons également validé que la fixation de HLA-G6-mFc à la surface de ces

cellules est spécifique à l'ILT4, car on n'observe aucun marquage après incubation avec HLA-G6-mFc sur les cellules H1299 WT (Figure 27, en gris).

En présence des trois formats du VHH-B8, on observe une diminution de la fixation de HLA-G6-mFc sur les cellules H1299-ILT4⁺ (Figure 27 B). Cette inhibition est bien due à la fixation des VHH B8 sur l'ILT4, car l'incubation avec un VHH contrôle non pertinent, spécifique de la protéine du système nerveux central β -amyloïd, n'entraîne aucune diminution du marquage. La capacité d'inhibition des trois formats de B8 a donc été mesurée à partir de cette population de cellules HLA-G6-mFc⁺ et les résultats sont présentés sur le graphique Figure 27 C. On observe à nouveau la meilleure efficacité des formats dimériques à inhiber l'interaction entre HLA-G6-mFc et ILT4.

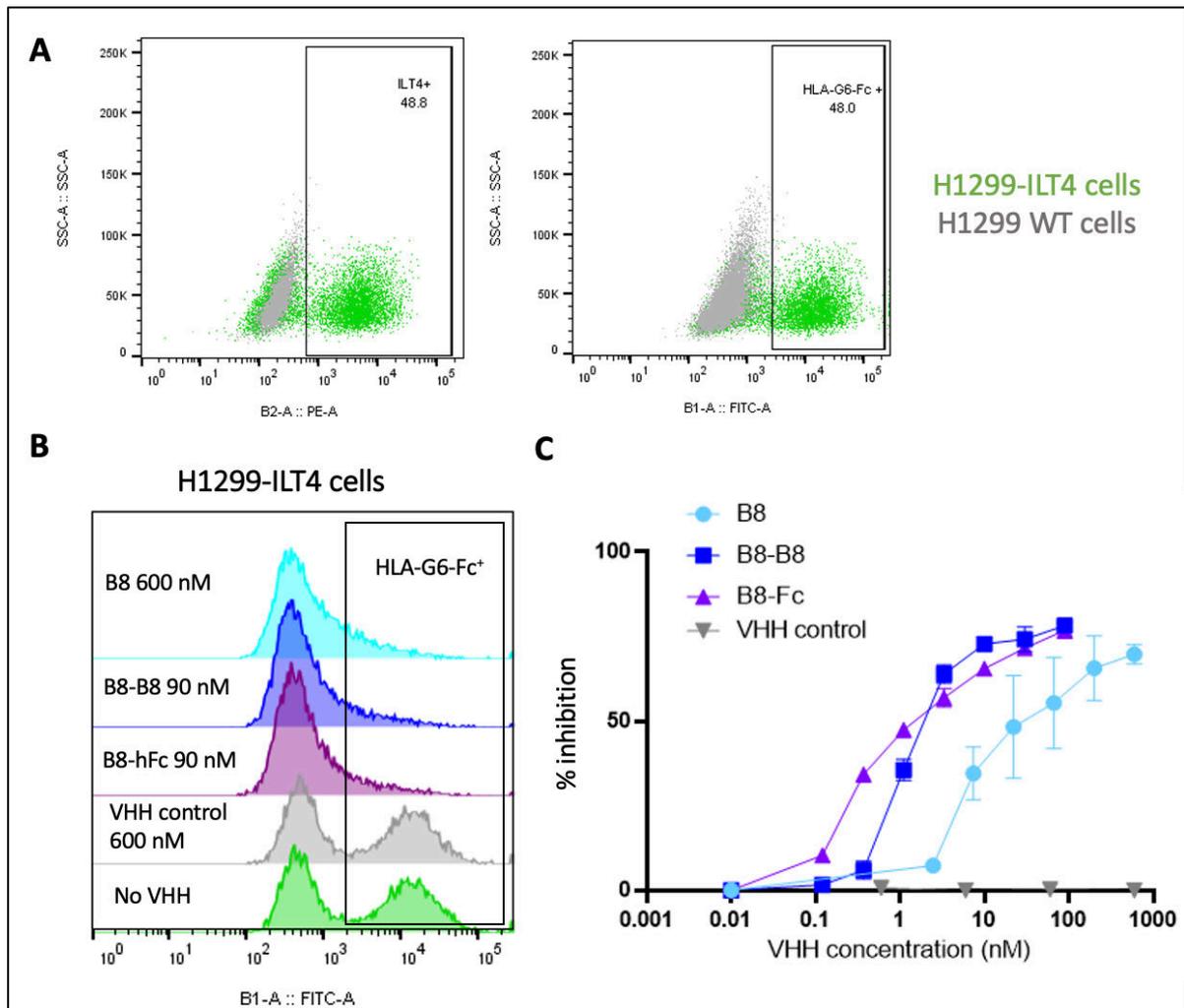


Figure 27: Validation de la compétition entre B8 et HLA-G6-mFc pour la fixation à l'ILT4 exprimé à la surface des cellules H1299-ILT4

- Validation de la fixation de HLA-G6-mFc à la surface des cellules H1299-ILT4.** Cytométrie en flux. A gauche, marquage des cellules avec 5 ng/mL du VHH B8-mFc couplé au PE (B8-mFc-PE). A droite, marquage des cellules avec 15 µg/mL de HLA-G6-mFc et détection par un anticorps secondaire anti-souris-FITC.
- Analyse de la fixation de HLA-G6-mFc à la surface des cellules H1299-ILT4 en présence de B8, B8-B8 ou B8-hFc.** Cytométrie en flux.
- Mesure de l'inhibition de l'interaction entre ILT4 et HLA-G6-mFc sur les cellules H1299-ILT4 par les trois formats de B8 ou un VHH isotype contrôle.** Cytométrie en flux. Les cellules H1299-ILT4 ont été incubées avec des concentrations croissantes de B8, B8-B8, B8-hFc ou du VHH anti-β-amyloïde contrôle.

Les essais de fixation de l'ANGPTL-2 sur les H1299-ILT4 n'ont pas permis de détecter l'ANGPTL2 fixée, nous n'avons donc pas pu réaliser les tests de compétition sur cellules avec ce ligand. Il est possible que l'affinité de l'ANGPTL2 monomérique pour l'ILT4 soit plus faible que celle de HLA-G6-mFc et nécessite une concentration plus grande que celle utilisée (au-delà de 20 µg/mL).

Les données présentées dans ce travail de caractérisation biochimique des VHH anti-ILT4 nous ont permis de sélectionner le VHH B8 pour la suite du projet. En effet ses capacités de fixation à l'ILT4 et d'inhibition des ligands fortement supérieures aux autres VHH, ainsi que sa spécificité pour l'ILT4 en font le meilleur candidat potentiel pour notre stratégie d'immunothérapie.

4) Études fonctionnelles des trois formats du VHH B8

a. Étude de l'effet antagoniste ou agoniste du VHH B8

Après avoir validé l'inhibition par le VHH B8 de l'interaction entre ILT4 et ses deux ligands, il est nécessaire de vérifier que le VHH n'est pas agoniste et que l'engagement du récepteur ILT4 n'aboutit pas à son activation. En effet, il existe des anticorps agonistes capables d'activer la voie de transduction liée à leur cible. Cette stratégie est d'ailleurs étudiée en immunothérapie anticancéreuse pour activer des signaux activateurs de cellules T, comme ICOS, 4-1BB ou OX40 (Linch et al. 2015) (Mayes et al. 2018).

Afin de vérifier cette propriété antagoniste ou agoniste de B8, il nous faut un modèle cellulaire nous permettant de mesurer l'activation de la voie de signalisation d'ILT4. Dans un premier temps, nous avons pensé à analyser l'état de phosphorylation des domaines cytoplasmiques ITIMs à la suite de l'engagement d'ILT4 par le VHH, par immunoprécipitation du récepteur puis analyse de son état de phosphorylation par Western blot. Cependant nous avons rencontré plusieurs contre temps pour la mise en place cette expérience. Premièrement, trouver une lignée cellulaire tumorale exprimant ILT4 à la surface s'est avéré plus compliqué que prévu (voir la partie « Résultat annexe 2 »). Ensuite, aucun des anticorps anti-ILT4 (mAb 42D1, mAb 27D6, mAb 287219, VHH anti-ILT4) disponibles au laboratoire ne détectent l'ILT4 en western blot (données non communiquées), nous avons donc testé d'autres références d'anticorps commerciaux et identifié le clone D6 pan-ILT (Santa Cruz) qui a montré de bons résultats de marquage (voir les résultats de production d'ILT4-ECD, Figure 31 B). Face à ces complications

techniques nous avons cherché une autre méthode pour étudier l'état d'activation du récepteur ILT4 à la surface cellulaire.

L'idée d'utiliser un test cellulaire avec une lignée cellulaire rapporteuse est venue des travaux de Shiroishi et al. (2006) qui ont mis au point une lignée exprimant un récepteur chimérique composé du domaine extracellulaire d'ILT2 fusionné au domaine intracellulaire de PIR-B. L'activation d'ILT2 à la surface de ces cellules entraîne l'expression de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein).

Après discussion avec les auteurs de la publication, nous avons appris que l'entreprise Promega avait mis au point récemment un système de test cellulaire rapporteur similaire avec l'ILT4. Le principe de ce test, illustré dans la Figure 28 A, est fondé sur la mesure de l'activité de l'enzyme luciférase, dont l'expression est modulée par l'état d'activation du récepteur ILT4. Lorsque le récepteur ILT4, exprimé sur les cellules effectrices Jurkat, est activé par HLA-G1 exprimé par les cellules activatrices (HLA-G aAPC/CHO, aAPC pour artificial Antigen Presenting Cell), l'expression de la luciférase est inhibée. Le blocage de cette activation restaure l'expression de la luciférase. Nous avons donc testé la capacité de nos trois formats du VHH B8 à inhiber l'interaction entre ILT4 et HLA-G1. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 28 B. Le graphique présente la variation de l'activité de la luciférase mesurée dans les puits traités avec différents anticorps, par rapport à l'activité basale de l'enzyme, mesurée dans des puits témoins n'ayant été traités avec aucun anticorps.

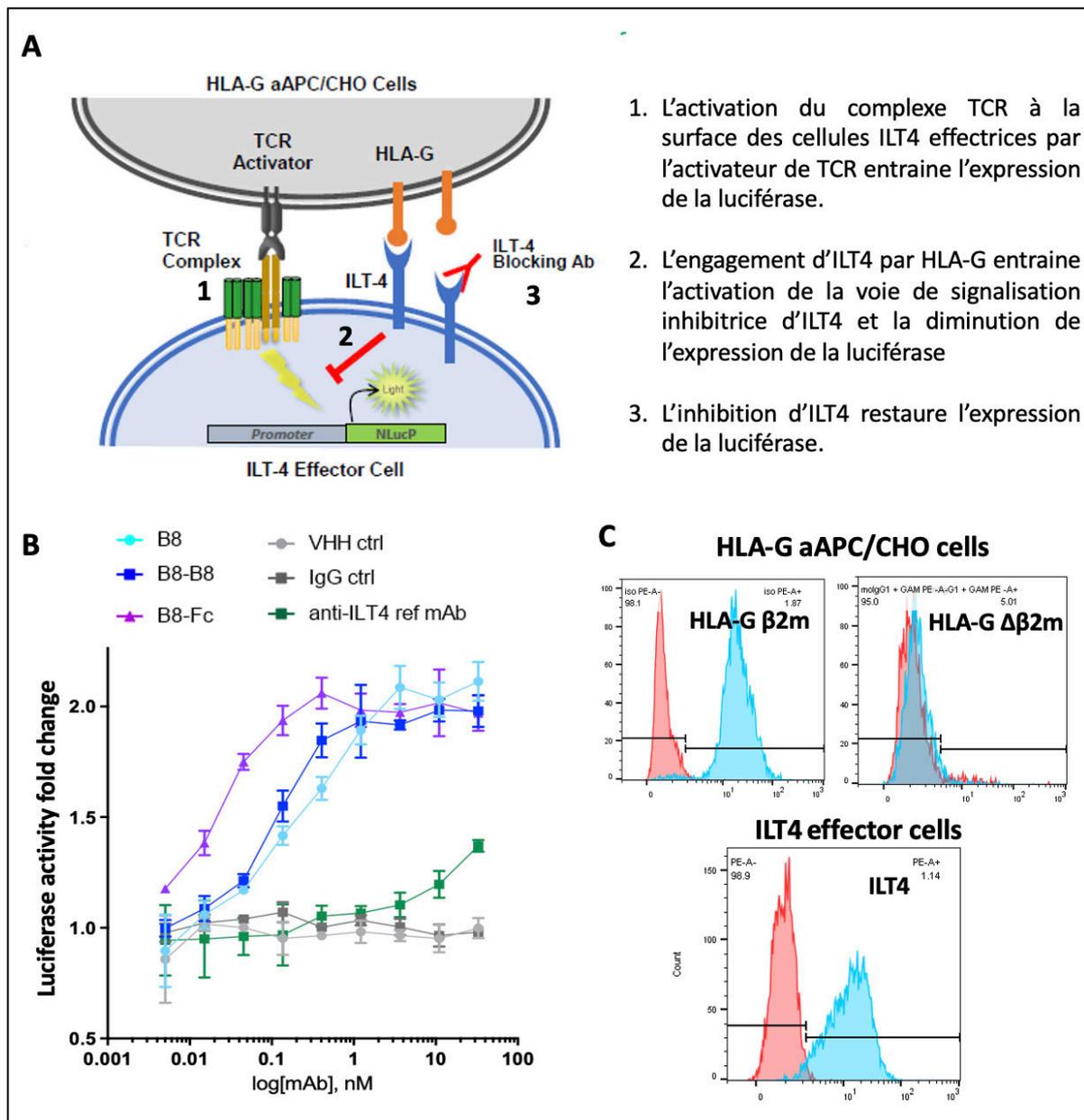


Figure 28 : Étude de l'effet antagoniste du VHH B8 sur le récepteur ILT4

A. Présentation de l'essai d'inhibition d'ILT4 sur la lignée rapportrice (Promega)

B. Mesure de la variation de l'activité de la luciférase en présence des AcM anti-ILT4.

Les données du graph correspondent à l'augmentation de l'activité de la luciférase par rapport aux puits contrôles sans anticorps (ratio luminescence puits test/luminescence puits contrôle).

C. Phénotypage des cellules CHO HLA-G et Jurkat-ILT4. En rouge l'isotype contrôle et en bleu l'anticorps testé. Les clones MEM/G-9 (Invitrogen) et 15E7 (Invectys) détectent HLA-G associée et non associée à β 2m, respectivement. Le clone 42D1 a été utilisé pour détecter ILT4.

On observe dans les cellules incubées avec les trois formats du VHH B8 une augmentation de l'activité de la luciférase corrélée à l'augmentation de la concentration des anticorps, à partir d'environ 0,01 nM pour B8-mFc et 0,03 nM pour B8 et B8-B8. L'inhibition totale du récepteur est atteinte entre 0,1 nM et 1 nM. Ces concentrations sont très faibles comparées à l'anticorps de référence anti-ILT4 (mAb 287219, R&D System) dont la concentration minimale permettant une faible inhibition est de 1 nM. L'augmentation de l'activité de la luciférase observée est bien liée à une inhibition spécifique d'ILT4, car les anticorps VHH et IgG contrôles n'entraînent aucune variation.

Ces résultats nous apportent donc la confirmation que le VHH B8, sous format monomérique comme dimérique, est bien antagoniste du récepteur ILT4. Ce test nous apporte également une information supplémentaire sur le mode d'action de B8. Nous avons vu précédemment que l'ILT4 reconnaît les isoformes de HLA-G possédant un domaine alpha 3 lié (HLA-G β 2m) ou non (HLA-G $\Delta\beta$ 2m) à la bêta-2-microglobuline, avec une affinité plus forte pour les isoformes liées à la β 2m (Shiroishi et al, 2006, Kuroki et al, 2019). Dans les tests de compétition en ELISA, c'est l'isoforme HLA-G6 $\Delta\beta$ 2m qui a été utilisée, et nous avons confirmé la capacité d'inhibition du VHH B8 pour cette isoforme. Promega nous a indiqué avoir choisi l'isoforme HLA-G1 pour générer la lignée de cellules aAPC/CHO activatrice, et qu'aucune construction de β 2m humaine n'a été co-transfectée. Cependant, grâce à un phénotypage des deux lignées cellulaires (Figure 28 C) nous avons constaté que HLA-G1 à la surface des cellules CHO était associée à la β 2m. En effet, nous avons utilisé deux anticorps spécifiques soit des isoformes HLA-G β 2m (clone MEM-G9) soit des isoformes HLA-G $\Delta\beta$ 2m (clone 15E7, Invectys) Seul le marquage avec le premier anticorps est positif. Bien que cet anticorps soit dirigé contre les protéines HLA-G β 2m humaines, il est possible qu'une réactivité croisée existe avec la β 2m de hamster.

En conclusion, ce test cellulaire nous permet de valider que les trois formats du VHH B8 sont antagonistes de l'ILT4 et ont une capacité d'inhibition supérieure à l'anticorps de référence (mAb 287219). Il nous apporte de plus l'information que le VHH B8 semble capable d'inhiber l'interaction avec HLA-G1 associé à la β 2m. Cette dernière hypothèse sera à confirmer dans un modèle exprimant HLA-G associé à la β 2m humaine.

b. Inhibition de la polarisation de macrophages vers un phénotype M2 pro-tumoral par le VHH B8

La caractérisation des trois formats de B8 nous a permis de valider les propriétés antagonistes du VHH. Afin d'étudier l'intérêt de ce VHH en immunothérapie, il faut également le tester dans un modèle reproduisant certaines conditions du microenvironnement tumoral.

L'équipe de Shu-Hsia Chen a étudié (Ma et al. 2011) le rôle potentiel de PIR-B dans la différenciation des cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSCs) vers un phénotype pro ou antitumoral, un mécanisme encore peu décrit. Ils ont comparé la croissance tumorale ainsi que le phénotype des cellules immunitaires infiltrantes dans deux modèles de souris, C57BL/6 WT ou délétées pour le gène PIR-B, dans lesquels ils ont injecté des cellules de carcinome de poumon de Lewis. Ils ont observé que les MDSCs avaient majoritairement un phénotype M1 antitumoral, associé à une expression de l'enzyme Oxyde nitrique Synthétase (iNOS) et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et que la croissance tumorale dans ces souris déficientes était significativement retardée. L'absence du récepteur PIR-B dans ce modèle limite la génération de macrophages immunosuppresseurs de type M2 et permet donc une meilleure réponse immunitaire antitumorale. A partir de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que le récepteur ILT4 humain exerçait les mêmes fonctions, et que son inhibition permettrait de reprogrammer des macrophages M2 vers un phénotype M1. Les résultats de ces travaux ont été publiés en 2018 (Chen et al. 2018). Les auteurs ont mis au point à partir de monocytes isolés de PBMCs de patients sains, un protocole de différenciation *in vitro* en macrophages pro-tumoraux (M2-like) par traitement à l'interleukine 4 (IL-4) ou antitumoraux par activation avec des lipopolysaccharides LPS (M1-like). Les marqueurs de différenciation de ces deux populations cellulaires sont entre autres CD14, CD163 et la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 (anti-inflammatoire) et TNF α (pro-inflammatoire). Chen et al. ont testé la capacité d'un anticorps antagoniste d'ILT4 à inhiber la différenciation des macrophages en phénotype M2. Dans leur protocole, l'anticorps anti-ILT4 est co-incubé avec le facteur de maturation M-CSF, puis les cellules sont traitées avec IL-4 ou le LPS. L'anticorps anti-ILT4 entraîne alors la diminution des marqueurs CD14 et CD163 ainsi que de la sécrétion de l'IL-10, et une augmentation de la sécrétion de TNF α , traduisant la reprogrammation vers un phénotype de macrophages de type M1.

Nous nous sommes basés sur ces travaux pour mettre au point le modèle de validation du VHH B8 sur les cellules immunitaires cibles de notre stratégie d'immunothérapie, c'est-à-dire les macrophages.

La mise en place de ce modèle a été réalisée en collaboration avec la Dr. Alix Jacquier et Odessa Fayet au sein d'Invectys, selon le protocole présenté dans la Figure 55 de la partie Matériel et Méthode. Il a été adapté de plusieurs articles présentant des protocoles de différenciation de macrophages en phénotypes M1 ou M2 (Wu et al. 2020) (Benner et al. 2019) (Poh and Ernst 2018) et plusieurs tests ont permis d'établir le protocole au laboratoire qui donnaient les meilleurs résultats de différenciation.

D'après les articles cités ci-dessus, les caractéristiques principales des macrophages M2 par rapport aux M1 sont une forte expression des marqueurs CD163 et CD206, et une faible expression du marqueur CD14. Cependant, certains M1-like pourraient également exprimer CD206 et CD163, une analyse du profil d'expression de cytokines est donc également nécessaire pour valider la fonctionnalité des macrophages, notamment par la sécrétion d'IL-10, TNF α ou IL-12.

Seuls les formats B8 et B8-B8 ont été utilisés pour ces tests, car lors de la mise en place du protocole nous avons constaté que les anticorps B8-Fc hIgG1 et mIgG2c entraînent une forte mortalité cellulaire. Cela est probablement dû à un effet d'ADCP, la phagocytose induite par la reconnaissance d'ILT4 à la surface des macrophages à la suite de la liaison des Fc des anticorps aux récepteurs Fc (FcR) activateurs. Une réactivité croisée entre l'IgG2c murin et les récepteurs Fc humain semble exister. Afin de contourner ce souci, une version du VHH B8 fusionnée à un Fc d'IgG4 humain, moins affin pour les récepteurs FcR, est actuellement à l'étude. L'anticorps anti-ILT4 étudié par Chen et al. est d'ailleurs un IgG4 humain et les auteurs n'ont pas mentionné de mortalité dans leur modèle *in vitro*.

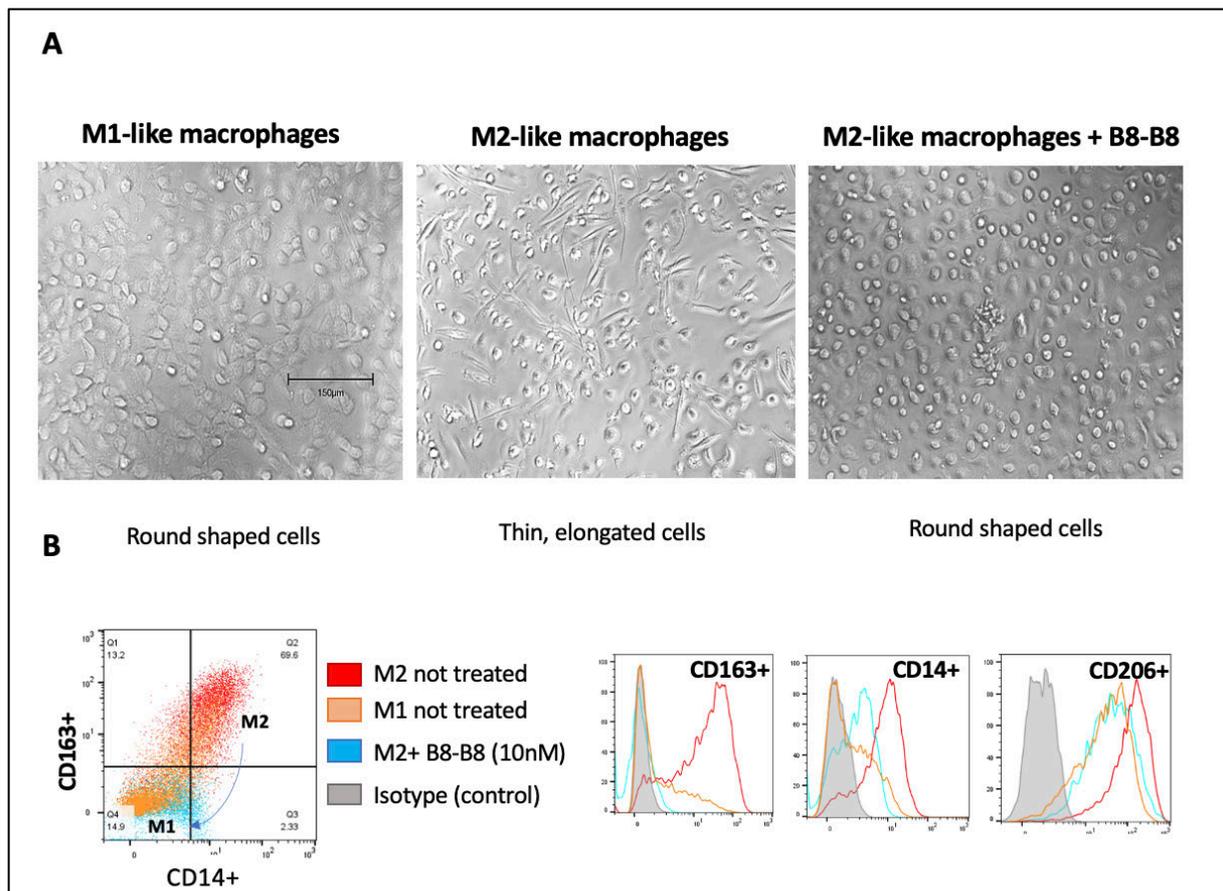


Figure 29 : Inhibition de la différenciation *in vitro* de macrophages en phénotype M2 pro-tumoral par les VHH B8 et B8-B8

- A.** Observation microscopique de la morphologie des macrophages traités ou non avec B8. A gauche, des macrophages M1, au milieu des macrophages M2 et à droite des macrophages M2 traités avec B8-B8 à 10 nM.
- B.** Analyse du phénotype des différentes populations de macrophages. Analyse par cytométrie en flux des marqueurs CD14, CD163 et CD206.

L'observation morphologique des macrophages (Figure 29 A) permet déjà d'observer une différence entre les macrophages M1 et M2. Les premiers ont une morphologie de cellules peu différenciées, rondes et non adhérentes, tandis que les M2 ont un phénotype très allongé et sont adhérentes. On observe que les macrophages M2 traités avec le VHH B8, illustré ici par le dimère B8-B8 à une concentration de 10 nM, ont une morphologie similaire aux M1. L'incubation des M2 avec le VHH contrôle anti- β -amyloïde n'entraîne pas ce changement de phénotype, ce qui valide que ce mécanisme est spécifique de l'inhibition d'ILT4.

Ce changement de morphologie s'accompagne également d'une différence d'expression des marqueurs de surface. Le profil d'expression de CD14 et CD163 par les M2 traités avec B8 est

similaire à celui des M1, tandis que les M2 non traités ou traités avec le VHH contrôle expriment fortement CD14 et CD163 (Figure 29 B).

Enfin, l'inhibition d'ILT4 par le VHH B8 induit également un changement fonctionnel des macrophages. Les M2 sont caractérisés entre autres par leur production d'IL-10 (Duan and Luo 2021). L'analyse quantitative d'IL-10 dans le surnageant des cellules montre une diminution de la production de l'interleukine par les M2 traités avec B8 et B8-B8 par rapport aux contrôles non traités, ou traités avec le VHH non relevant (Figure 30, B). La sécrétion de TNF α et IL-12 par les M2 a également été analysée, afin de voir si le traitement par B8 augmentait l'expression de ces interleukines antitumorales. Cependant les résultats des ELISA n'ont pour l'instant pas été concluants et ces expériences sont en cours de mise au point.

Toutes les modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelle induites par le VHH-B8 sont dose-dépendant, et on constate de nouveau l'efficacité augmentée du format dimérique, capable d'inhiber la différenciation des macrophages à des doses inférieures au B8 monomérique (Figure 30 A).

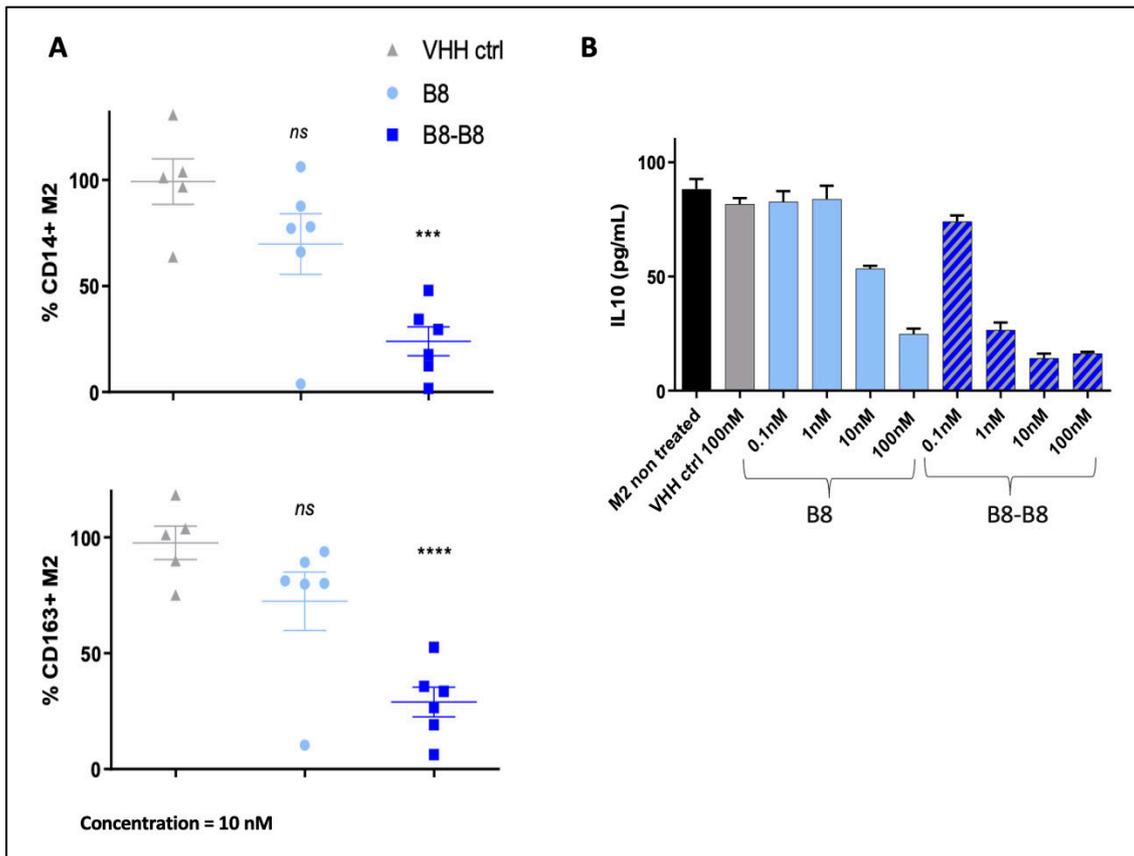


Figure 30 : Comparaison de l'efficacité d'inhibition de la différenciation en macrophage M2 entre le format monomérique et dimérique de B8

- A.** Comparaison phénotypique des macrophages M2 traités avec le format monomérique ou dimérique de B8. Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression de CD14 et CD163 par les M2 traités avec 10 nM de B8, B8-B8 ou du VHH isotype contrôle. Le pourcentage d'expression des marqueurs CD14 et CD163 a été calculé à partir de la condition macrophages M2 non traités à partir de PBMCs de six donneurs, et l'analyse statistique réalisée par test de Student non apparié.
- B.** Analyse du profil sécrétion de l'IL-10 par les différentes populations de macrophages. Quantification par ELISA de l'IL-10 produit par les différentes populations cellulaires. Les données ont été normalisées par rapport à la quantité de cellules par condition.

5) Conclusions et perspectives de la première partie expérimentale

Dans les tests de compétition en ELISA, nous avons comparé les capacités inhibitrices des trois formats du VHH B8 à celles de deux anticorps anti-ILT4 commerciaux de référence. L'anticorps 27D6 est une IgM de rat, ayant été décrite comme capable d'inhiber l'interaction entre ILT4 et HLA-G5 et G6 (McIntire et al. 2004). Dans notre design expérimental, nous n'obtenons pas une inhibition totale de l'interaction avec HLA-G6 par 27D6, mais un plateau à environ 80% (Figure 26 B). L'IC50 de 27D6 calculée ici est supérieure à celle des deux formats dimériques de B8. Nos VHH B8 semblent donc plus efficaces que l'anticorps 27D6 pour empêcher la fixation de HLA-G6-mFc à l'ILT4. Par ailleurs, nous montrons ici que cet anticorps est capable d'inhiber totalement l'interaction entre ILT4 et l'ANGPTL2. Son IC50 est inférieure à celles des trois formats de B8, à 4.4 nM, soit six fois inférieure à celle de B8-mFc. Cependant, il est important de rappeler que l'anticorps 27D6 est une IgM, et que sa structure pentamérique présente donc dix paratopes au total. Le mécanisme d'inhibition de cet anticorps est donc lié soit à une haute avidité pour sa cible, soit à un encombrement stérique due à sa très grande taille (970 kDa). Une concentration molaire de 4.4 nM pour cet anticorps correspond ainsi à 3.9 µg/mL, tandis que l'IC50 du VHH B8, soit 44.1 nM, équivaut à 0.8 µg/mL. Dans une thérapie, la nécessité d'injecter une forte dose d'anticorps au patient serait un réel désavantage, notamment à cause du coût très élevé de production des anticorps monoclonaux dans des conditions cliniques GMP (Good Manufacturing Practice) et encore plus un format IgM très compliqué à produire et purifier (Chromikova et al. 2015). L'IC50 de l'anticorps 42D1 n'a pas pu être calculée, l'anticorps présentant des capacités d'inhibition des interactions avec les deux ligands très faibles, inférieures à 30% même à forte concentration à 1 µM (Figure 26 B).

Dans le modèle macrophages, le traitement par B8 a été effectué à l'initiation du processus de différenciation, et aucun ajout de B8 n'a été réalisé par la suite. Cela nous permet de valider que l'inhibition d'ILT4 par notre VHH est suffisante pour bloquer le processus de différenciation en M2 induit par les facteurs MCSF et Interleukine 4 (IL-4). Cependant dans le cadre d'une immunothérapie antitumorale, le VHH B8 serait administré une fois la tumeur établie. Les cibles du VHH seront donc à la fois des macrophages non différenciés, comme dans notre modèle, mais également des TAMs ayant déjà subi le processus de différenciation. Il faut donc valider que le blocage d'ILT4 sur ces macrophages totalement différenciés est suffisant pour les

reprogrammer vers un phénotype M1 et réactiver efficacement la réponse effectrice antitumorale. Une expérience de reprogrammation *in vitro* est prévue par la suite, dans laquelle B8 sera ajouté à l'issue du processus de différenciation afin de vérifier qu'il permette la reprogrammation. La caractérisation phénotypique des macrophages par l'expression de marqueurs de surface est une première approche afin de déterminer la polarisation des cellules, cependant la classification en M1 et M2 des TAM est restrictive et des marqueurs de surface identifiés comme spécifiques d'une population peuvent être exprimés par les deux populations (Wang et al. 2022). L'analyse fonctionnelle des macrophages, par quantification de la sécrétion de différentes cytokines pro ou anti inflammatoires est donc nécessaire afin de caractériser la fonction des macrophages obtenus après le traitement par B8. Des données préliminaires (ELISA, données non montrées) nous indiquent que les macrophages M2 expriment fortement la molécule CCL2 et que l'incubation de ces macrophages avec B8 réduit sa sécrétion. Cette chimiokine est impliquée dans l'angiogenèse et le recrutement de monocytes et macrophages dans le microenvironnement tumoral (TME,) et a été identifiée comme un facteur pro-tumoral à cibler en immunothérapie (Wang et al, 2022). Ce résultat préliminaire nous apporte donc une nouvelle information sur le potentiel du VHH B8 comme immunothérapie.

L'analyse transcriptomique est également une approche envisagée pour la suite de l'étude. Elle permet de définir les voies de signalisation et les gènes régulés différemment entre des cellules traitées dans deux conditions différentes. L'étude réalisée par Chen et al, en 2018 a permis de montrer que l'inhibition d'ILT4 sur des macrophages M2-like par un anticorps antagoniste, entraîne une altération de l'expression de gènes liés à la régulation de l'inflammation en comparaison à des macrophages M2-like non traités. Un projet d'analyse transcriptomique est en cours de réalisation, sur des macrophages M2-like traités avec les différents formats de B8.

Pour conclure cette première partie de résultats générés au cours de la thèse, les différentes études mises en place nous ont permis de sélectionner un VHH antagoniste spécifique du récepteur ILT4, pour lequel il a une forte affinité. La fixation de ce VHH B8 sur le récepteur inhibe son interaction avec deux de ses ligands, l'ANGPTL2 et HLA-G1/G6. L'activité antagoniste du VHH B8 empêche la différenciation *in vitro* de macrophages vers un phénotype M2-like après incubation avec M-CSF et l'Interleukine 4 (IL-4). Les macrophages traités avec le VHH B8

présentent un phénotype similaire aux macrophages M1-like avec une expression faible de CD14 et pas d'expression de CD163, et une diminution de la sécrétion d'IL-10. Deux formats homodimériques du VHH B8 ont été générés, par fusion à la région Fc d'une IgG humaine ou par liaison avec un lien d'acides aminés glycine-sérine. Ces deux formats bivalents ont une avidité augmentée pour l'ILT4 par rapport à la forme monomérique, et permettent d'inhiber les fonctions du récepteur à des concentrations plus faibles comparés au monomère. Tous ces résultats sont très prometteurs quant au potentiel du VHH B8 comme immunothérapie de reprogrammation du microenvironnement immunosuppresseur.

II. Criblage de cristallogénèse du complexe VHH B8/ILT4-ECD

1) L'objectif de l'étude

Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec deux plateformes de l'Institut Pasteur. Pour la production de la protéine recombinante, je me suis appuyée sur l'expertise de la Plateforme de Production et Purification des Protéines dirigée par Stéphane Pétres, chez qui j'ai été formée à la technique de production en cellules eucaryotes Expi293™. Ensuite, le criblage de cristallogénèse du complexe a été réalisé dans la Plateforme de Cristallographie dirigée par le Dr. Ahmed Haouz, qui m'a également formée pour le suivi de la formation des cristaux.

Plusieurs catégories d'inhibiteurs dans le domaine de l'enzymologie ont été définies, selon leur mode de fixation sur l'enzyme. Parmi les plus observées on peut citer (i) l'inhibiteur compétitif, qui entre en compétition directe avec le substrat vis à vis du site actif de l'enzyme, (ii) l'inhibiteur non compétitif, qui inhibe l'activité enzymatique en se fixant sur un site autre que le site actif (iii) l'inhibiteur allostérique, qui entraîne une modification structurale du site allostérique, changement conformationnel propagé jusqu'au site actif de l'enzyme. Ces modes d'inhibition peuvent être transposés à une interaction anticorps-antigène, et on peut se demander par quel mécanisme le VHH-B8 entre en compétition avec les ligands d'ILT4. Le VHH se fixe-t-il au niveau du site d'interaction entre ILT4 et les ligands ? Ou bien la fixation de B8 sur un autre épitope d'ILT4 entraîne-t-il un changement de conformation du récepteur ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons souhaité définir avec précision l'épitope reconnu par le VHH B8. Une des approches permettant de déterminer le site d'interaction entre deux macromolécules est la résolution de la structure du complexe à l'échelle atomique. Nous avons donc entrepris de résoudre la structure du complexe ILT4-B8 par la méthode de la bio-cristallographie utilisant la diffraction des rayons X. L'utilisation de cette technique l'obtention de cristaux exploitables de notre complexe protéique.

L'obtention de ces cristaux diffractant les rayons X constitue le goulot d'étranglement dans un projet de résolution de structure par cristallographie. Le processus de cristallisation est empirique car il dépend de plusieurs facteurs incluant la taille, la nature, la dynamique, la qualité et la quantité de la macromolécule purifiée (weber et al 2019). Généralement, plus la taille de la protéine est élevée, moins on a de chance de la cristalliser. De même qu'il est plus

difficile de cristalliser une protéine membranaire comme en témoignent les statistiques de la Protein Data Bank (PDB : (<https://www.rcsb.org/>)). L'introduction de l'automatisation dans le pipeline de cristallographie nous aide à répondre rapidement à la question suivante : mon échantillon va-t-il générer des cristaux ? Pour notre étude, nous avons d'abord discuté du choix du format des protéines ILT4 et B8 à utiliser pour réaliser le complexe. En effet, le screening de cristallogénèse nécessite plusieurs milligrammes de chacune des protéines. La protéine recombinante ILT4-hFc (R&D systems) utilisée jusqu'ici dans les tests de compétition étant très coûteuse, et cette protéine chimérique a un haut poids moléculaire (110 kDa). Ces deux aspects nous ont orienté vers la mise en place d'un procédé de production de la région extracellulaire d'ILT4 (ILT4-ECD). Pour le VHH, il nous est apparu évident d'utiliser le format monomérique, en raison de sa petite taille.

Nous présenterons dans un premier temps la mise en place du procédé de production d'ILT4-ECD, puis la purification du complexe ILT4-ECD/VHH-B8 et les résultats obtenus lors du criblage de cristallogénèse.

2) La mise en place de la méthode de production et purification d'ILT4-ECD, et la validation de la protéine produite

Le choix de la méthode de production d'ILT4-ECD s'est orienté vers le système d'expression en cellules eucaryotes Expi293™ avec le vecteur d'expression pFuse, car même si chaque protéine est différente, nous avons obtenu de bons rendements pour la production des VHH-Fc avec ce système d'expression.

La construction pour exprimer ILT4-ECD a été conçue de la façon suivante (Figure 31 A) : il est composé de la région extracellulaire d'ILT4 (UniProt Q8N423, Gly24-His458), une étiquette de détection (Flag) et une étiquette de purification (8His). Afin d'éliminer les étiquettes de la protéine, qui pourraient entraver le processus de cristallogénèse, nous avons introduit un site de clivage par l'enzyme du « Tobacco Etch Virus » (TEV). Enfin la position C ou N terminale des tags est un paramètre important pour la production de protéines recombinantes. En effet, la position du tag peut avoir un impact sur le rendement de production et sur la qualité de la protéine produite. La présence d'un tag en N-terminal peut interférer avec l'étape de clivage du peptide signal de sécrétion. La position N ou C-terminale peut gêner le repliement natif de la protéine, ou encore le tag peut être clivé durant la production de la protéine et dans ce cas l'étape de purification peut s'avérer compliquée. Nous avons donc décidé de générer les deux

options de constructions ILT4-ECD, avec les tags en position C-terminal ou N-terminal (appelées ILT4-ECD C-ter ou N-ter). Un codon stop a été ajouté à l'extrémité 3' du gène pour permettre l'expression d'ILT4-ECD non fusionné à la région Fc présente sur le plasmide pFuse. Les deux gènes synthétiques des constructions ILT4-ECD ont été générés par un fournisseur (GeneArt, Thermofisher) et le clonage directionnel en pFuse par digestion enzymatique et ligation T4 a été réalisée selon le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes.

Un premier test de production à petite échelle a été réalisé, avec plusieurs objectifs : (i) tester que le niveau d'expression de la protéine ILT4-ECD est suffisant pour obtenir la quantité nécessaire à la cristallographie, (ii) valider la méthode de purification, et (iii) s'assurer que la protéine produite est correctement repliée.

L'analyse des résultats de purification de cette première production a permis de valider l'expression des deux protéines (Figure 31 B) par migration sur gel SDS-PAGE. Premièrement, l'analyse en Western blot avec un anticorps spécifique des ILTs a permis de confirmer l'expression de la protéine, car on observe pour les deux constructions une bande à 70kDa (Figure 31B). Le poids moléculaire attendu d'ILT4-ECD est de 51 kDa, cependant il existe plusieurs sites de glycosylation sur ILT4 (base de données UniProt Q8N423) ce qui peut expliquer le poids moléculaire apparent plus élevé. En effet, après déglycosylation (Protein Deglycosylation Kit Mix II, NEB) on observe une diminution du poids moléculaire d'une dizaine de kDa entre la protéine non traitée et la protéine déglycosylée (voir « Résultat Annexe 3 »).

Ensuite, l'analyse des fractions d'élution de la purification d'affinité (HisTrap) en bleu de Coomassie révèle la présence d'une bande majoritaire de forte intensité à 70 kDa, correspondant donc à l'ILT4-ECD. Il est intéressant de noter qu'à ce stade de l'analyse, on n'observe pas de différence majeure entre l'expression de la protéine ILT4-ECD N-ter et C-ter. Il semblerait seulement que la protéine N-ter soit plus dégradée que la protéine C-ter, car on observe plusieurs bandes contaminantes de faible poids moléculaire après coloration au bleu de Coomassie (Figure 31B, gel de droite).

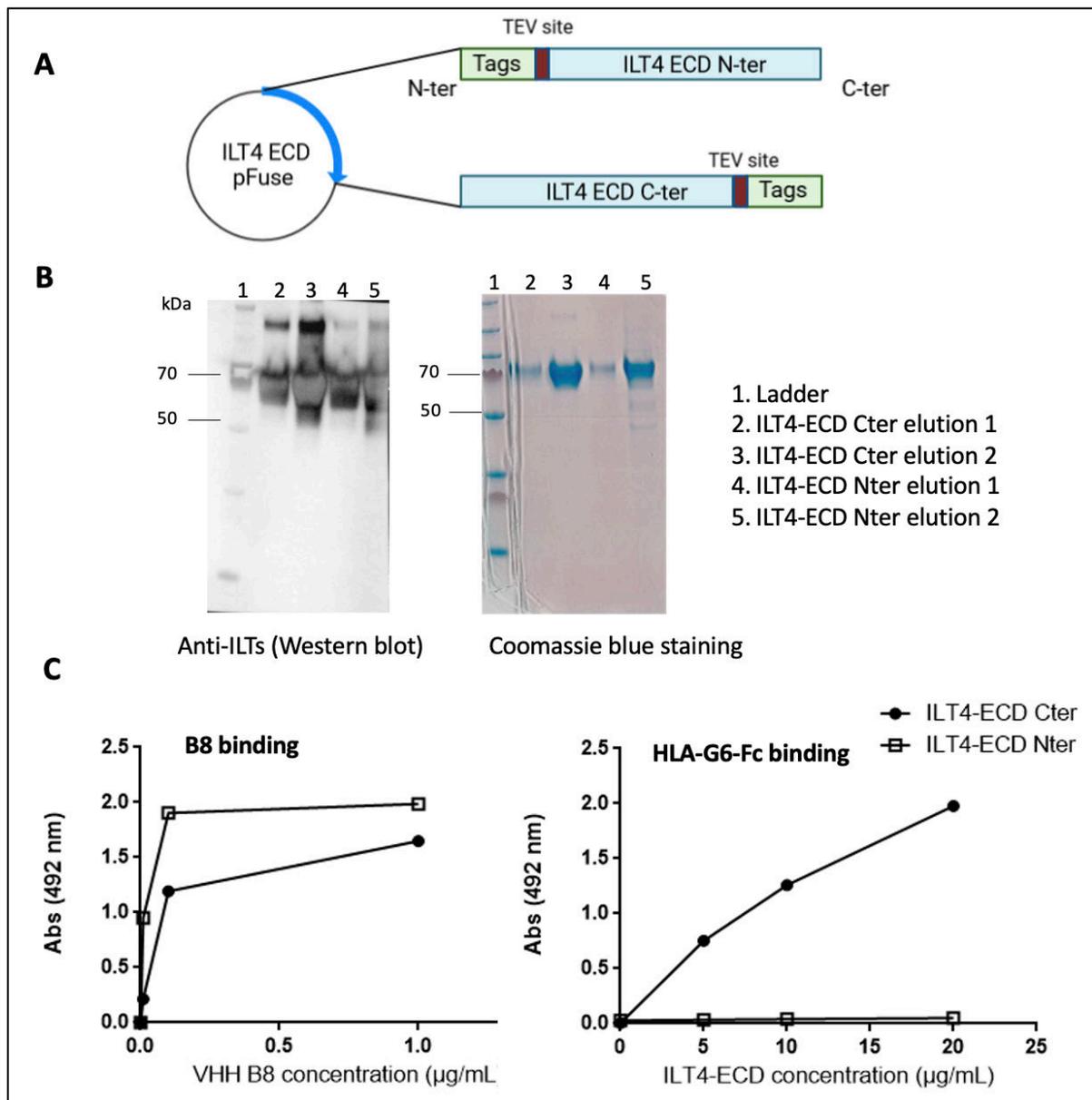


Figure 31 : Développement du procédé de production et caractérisation de la protéine ILT4-ECD

A. Schéma des deux vecteurs d'expression pFuse-ILT4-ECD avec les étiquettes en C-terminal ou N-terminal. Dans les deux cas un codon stop en C-terminal permet l'expression d'ILT4 non fusionné à la région Fc.

B. Analyse par SDS-PAGE des protéines produites. A gauche: analyse par bleu de Coomassie des fractions d'éluion de purification d'affinité sur billes agarose-cobalt, à droite: analyse par Western blot avec un anticorps primaire pan- ILTs (clone D6) et révélation par un anticorps anti-souris HRP.

C. Analyse de la capacité des protéines ILT4-ECD à se fixer à B8 ou HLA-G6-mFc. ELISA indirect. A gauche : ILT4-ECD est immobilisé et incubé avec différentes concentrations du VHH-B8. La présence du VHH est détectée par un anticorps anti-cMyc-HRP. A droite : HLA-G6-mFc est immobilisé et incubé avec des concentrations croissantes d'ILT4-ECD. La présence d'ILT4-ECD est détectée par un anticorps anti-His-HRP.

Le dosage des protéines par spectrophotométrie à 280 nm (Nanodrop) a permis d'estimer la quantité d'ILT4-ECD produite avec chacune des constructions à environ 310 µg, à partir d'un volume de production de 50 mL. Bien que le ratio entre la quantité de protéine produite et le volume de culture cellulaire ne soit pas totalement linéaire, on peut estimer qu'en augmentant le volume de 30 fois, soit un volume de 1,5 L, on pourrait obtenir environ 9 mg de la protéine.

Après avoir validé l'expression d'ILT4-ECD par Western blot, nous avons voulu vérifier que la protéine produite est correctement repliée et avons mis au point pour cela deux méthodes ELISA (voir la partie Matériel et Méthode).

Bien qu'un test ELISA ne permette pas de valider la conformation entière de la protéine, on peut penser que si les sites de fixation de l'ILT4 à B8 et à HLA-G6 sont correctement repliés, alors il en va de même pour la protéine entière. Les résultats des deux tests ELISA, réalisés avec les protéines ILT4-ECD C-ter et N-ter, sont présentés dans la Figure 31C.

Il est très intéressant de noter que seule la protéine ILT4-ECD Cter est capable de se lier à HLA-G6-mFc. Les domaines D1-D2, dans lesquels se situent le site d'interaction entre HLA-G et l'ILT4, sont situés dans la région N-terminale (Shiroishi et al, 2006). On peut donc imaginer que la présence des tags en N-terminal gêne l'accès au site d'interaction, ou bien qu'il en modifie la conformation. En revanche le VHH B8 reconnaît les deux protéines ILT4-ECD produites. Les tags en N-terminal ne gênent donc pas l'accès à son épitope. Ces premiers résultats nous ont permis de valider que le système d'expression Expi293™ et de purification fonctionnent pour cette nouvelle protéine, et nous sommes optimistes sur la possibilité d'atteindre à minima les 6 mg d'ILT4 requis pour réaliser le premier criblage de cristallogénèse. De plus pour notre application, nous avons choisi la construction ILT4-ECD-Cter. Dans la suite du manuscrit pour simplifier, nous ferons référence à cette protéine par « ILT4-ECD ».

3) La production d'ILT4-ECD pour la formation du complexe avec le VHH-B8

Une fois la qualité de la protéine ILT4-ECD validée, ainsi que la faisabilité de la production, nous avons réalisé la production de la protéine à plus grande échelle, afin d'obtenir à *minima* les 6 mg d'ILT4-ECD nécessaires pour le criblage. À la suite de des discussions avec la Plateforme de Production et de Purification des protéines, une étape supplémentaire a été ajoutée dans le procédé de purification de la protéine (Figure 32 A). En effet, le milieu de production Expi293™

contient de l'EDTA, qui permet de limiter la formation d'agglomérats cellulaires par liaisons entre des protéines d'adhésion intercellulaires. La présence d'EDTA est cependant délétère pour l'étape de purification, car c'est un composé chélatant qui décroche les ions Ni^{2+} fixés à la matrice de la colonne de chromatographie d'affinité. Ceci entraîne alors une perte de la protéine d'intérêt et un faible rendement de purification. Nous avons donc ajouté une étape de diafiltration après la récolte du surnageant de culture et avant la purification d'affinité. Cette technique permet de changer le tampon d'une solution contenant des protéines grâce à un filtre poreux dont la limite de filtration est inférieure au poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Par un système automatisé de pompes péristaltiques (Akta Flux), le milieu de culture contenant la protéine d'intérêt est dans un premier temps concentré, puis mélangé au nouveau tampon. Le tampon utilisé pour la purification dans notre cas est à base de TRIS et non de PBS, car la présence de phosphate dans les échantillons protéiques entraîne la formation de cristaux de sels, que nous essayons d'éviter durant les expériences de cristallogénèse.

Les fractions récoltées aux différentes étapes de la purification ont été analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, afin de confirmer la présence de la protéine ILT4-ECD dans les fractions d'élution et d'évaluer la pureté de ces éluions. Les puits 3 et 4 sur le gel de la Figure 32 B correspondent à la fraction non-retenue sur la colonne lors de l'application des échantillons. On observe la présence d'une bande de forte intensité à 70 kDa, qui correspond à l'ILT4 ECD. Cela nous indique que la colonne a été saturée par la quantité d'ILT4-ECD présente dans l'échantillon et que la totalité de la protéine n'a pas été retenue. Les fractions 9 à 15 correspondent aux fractions d'élution. On observe cette fois-ci la protéine ILT4 ECD majoritairement présente dans ces fractions, bien qu'elles contiennent également des protéines contaminantes (Figure 32 B).

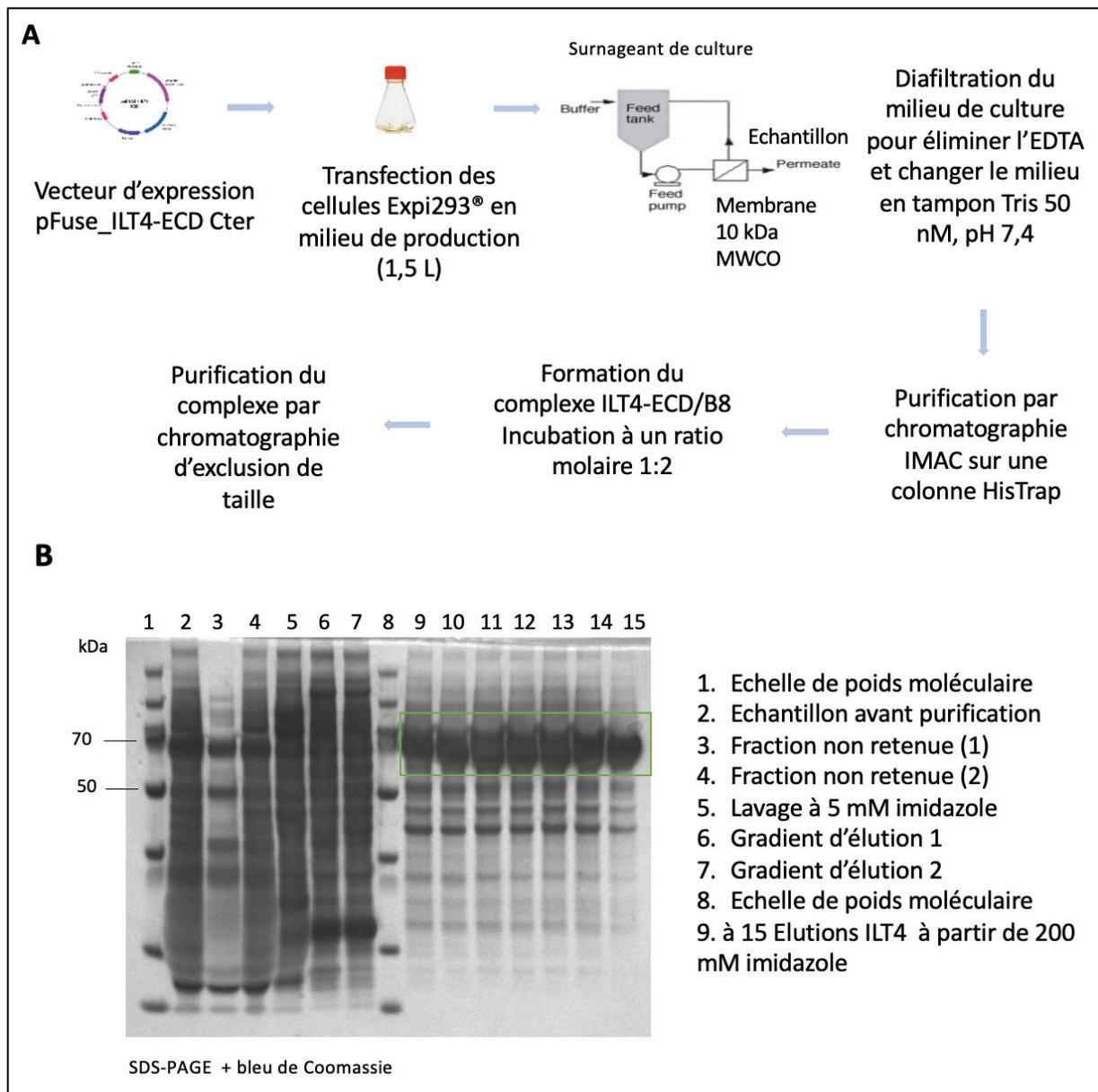


Figure 32 : Production et purification d'ILT4-ECD pour le criblage de cristallogénèse

A. Présentation du protocole depuis la production d'ILT4-ECD jusqu'à la purification du complexe ILT4-ECD/B8

B. Purification d'ILT4-ECD et analyse du rendement de la production. Analyse des fractions de purification par chromatographie d'affinité (HisTrap) par SDS-PAGE en conditions réductrices, dénaturantes et coloration en bleu de Coomassie.

Pour optimiser la méthode de purification par la suite, deux paramètres seraient à modifier : (i) utiliser une colonne de chromatographie de plus grande capacité de rétention, et (ii) augmenter le volume de lavage de la colonne en utilisant un tampon de lavage contenant 50 mM d'imidazole afin d'éliminer le maximum de protéines contaminantes avant de décrocher l'ILT4-ECD.

En prenant en compte les protéines contaminantes, nous avons estimé que les fractions de purification sont composées à 90% d'ILT4-ECD, correspondant à une quantité totale d'ILT4-ECD à 20 mg. Cette quantité est amplement suffisante pour réaliser le complexe avec le VHH B8. La pureté de la protéine est un élément crucial pour la formation de cristaux de bonne qualité. Les protéines contaminantes présentes dans les fractions d'élution d'ILT4-ECD seront éliminées par la suite, lors de l'étape suivante de purification du complexe protéique par chromatographie d'exclusion de taille.

4) Purification du complexe VHH B8/ILT4 ECD par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

Pour optimiser la formation du complexe, nous avons choisi d'incuber les protéines avec un excès de VHH, pour un ratio molaire ILT4 / VHH de 1 pour 2. Les fractions de purification de l'ILT4-ECD numéro 9 à 15 (Figure 32, B) ont été utilisées pour réaliser le complexe.

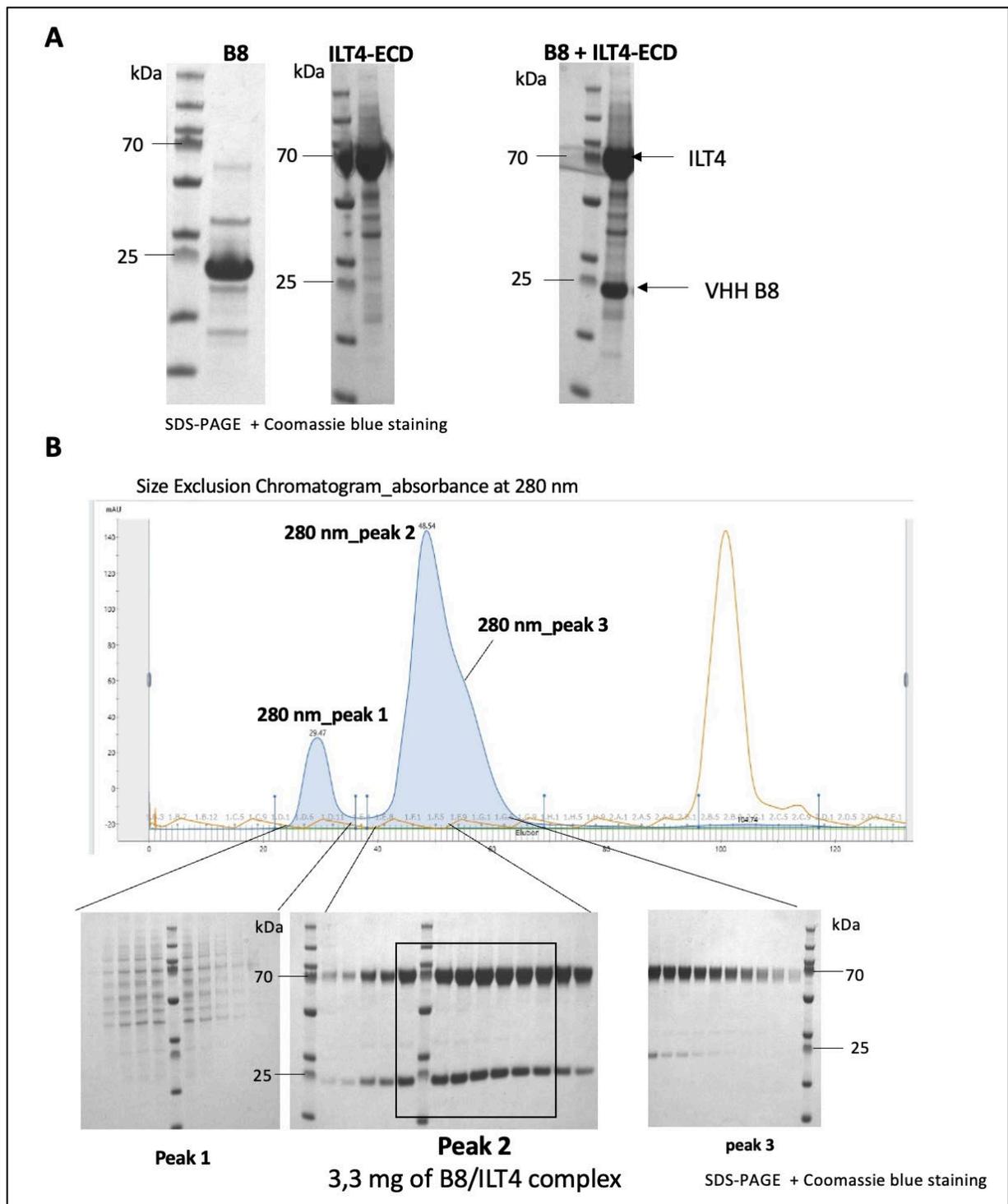


Figure 33 : Purification du complexe ILT4/B8 pour le criblage de cristallogénèse

A. Analyse des fractions du complexe ILT4-ECD/B8 avant purification par SEC. SDS PAGE en conditions dénaturantes et réductrices, coloration au bleu de Coomassie.

B. Purification du complexe par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) sur une colonne HiLoad Superdex 16/600 200 µg (séparation de protéines de poids moléculaire compris entre 10 kDa et 600 kDa)

L'analyse SDS-PAGE du mélange de l'ILT4-ECD et du VHH-B8 est présentée sur la figure 33 A. On observe les deux protéines ainsi que beaucoup de protéines contaminantes issues de la purification de l'ILT4-ECD. Après l'étape d'incubation, le complexe a été purifié par chromatographie d'exclusion de taille (SEC), une méthode qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur poids moléculaire, grâce à une matrice contenant des pores de différentes tailles. Les molécules les plus grandes sont éluées en premier.

Le chromatogramme de la figure 33 B présente l'absorbance à 280 nm mesurée dans chacune des fractions d'élutions. On observe deux pics d'absorbance distincts, correspondant à l'élutions de protéines de poids moléculaires différents. L'analyse SDS-PAGE en bleu de Coomassie nous indique que le complexe se trouve dans le deuxième pic. En effet, on observe clairement deux bandes majoritaires à 70 kDa et 20 kDa correspondant, respectivement, à l'ILT4-ECD et au VHH B8. Le taux de pureté de cette fraction du complexe est proche de 100%, la grande majorité des protéines contaminantes présentes avant la SEC ayant été éliminées dans le premier pic. On distingue un épaulement à la suite du deuxième pic, qui correspond en fait à un troisième pic chevauchant. Cela s'explique par l'élution de protéines de poids moléculaire très proche, et l'analyse SDS-PAGE nous montre que ce dernier pic est constitué d'ILT4-ECD uniquement.

Pour les expériences de cristallogénèse haut débit, nous avons sélectionné les fractions d'élution du complexe contenant la même proportion d'ILT4 et de VHH, encadrées sur le gel de la figure 33 B. Nous avons rassemblé ces fractions, contenant un total de 3.3 mg du complexe, et nous les avons concentrées par ultrafiltration (Vivaspin, 10 kDa MWCO) jusqu'à une concentration finale de 6,6 mg/mL. Une analyse du complexe par la technique de diffusion de lumière (DLS) a permis de valider la qualité du complexe concentré (Figure 34).

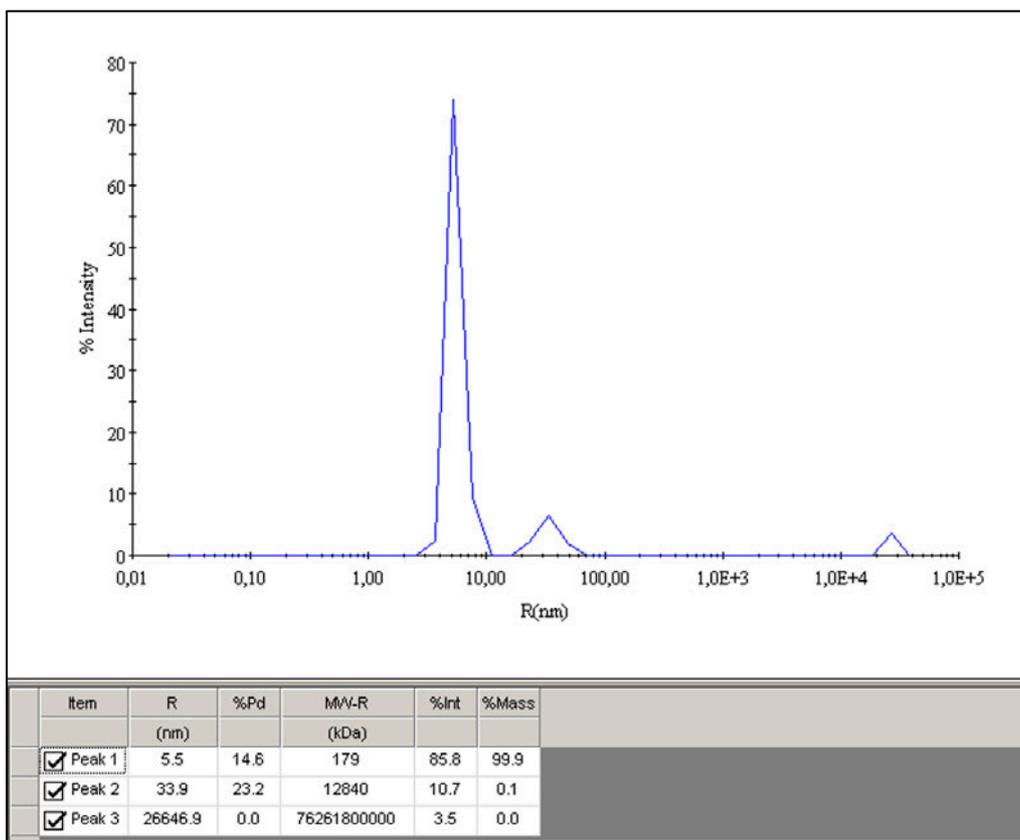


Figure 34 : Analyse par diffusion dynamique de la lumière (DLS) de l'échantillon du complexe ILT4-VHH B8 après concentration

D'après l'analyse la figure 34, la majorité de l'échantillon est composé de molécules d'un poids moléculaire apparent estimée à 179 kDa, et la population des molécules est contaminée par 0,1% d'agrégat. Cette contamination est très faible et ne va pas interférer avec la cristallisation. En conclusion, on peut dire qu'à cette concentration, le complexe est sous forme dimérique en solution.

5) Criblage de cristallogénèse

Le temps nécessaire à la formation de cristaux est dépendant de plusieurs paramètres dont on peut citer (i) la nature de l'échantillon protéique, (ii) la méthode de cristallisation et (iii) la composition chimique de la condition de cristallisation. Cet évènement peut avoir lieu juste après la mise en contact avec la solution de cristallisation ou bien des mois après. La figure 35 (adaptée de Benvenuti and Mangani 2007) illustre les différentes situations résultant d'un criblage de cristallogénèse. Dans les gouttes de cristallisation, on peut observer différents

événements : (i) de gros agrégats correspondant à des protéines dénaturées à causes des concentrations très élevées des agents cristallisants (Figure 35 a), (ii) des gouttes claires à causes des concentrations très faibles de la protéine et des agents cristallisants (Figure 35 b) (iii) des séparations de phases (Figure 35 c) et (iv) des cristaux de plus ou moins bonne qualité (Figure 35 g à j).

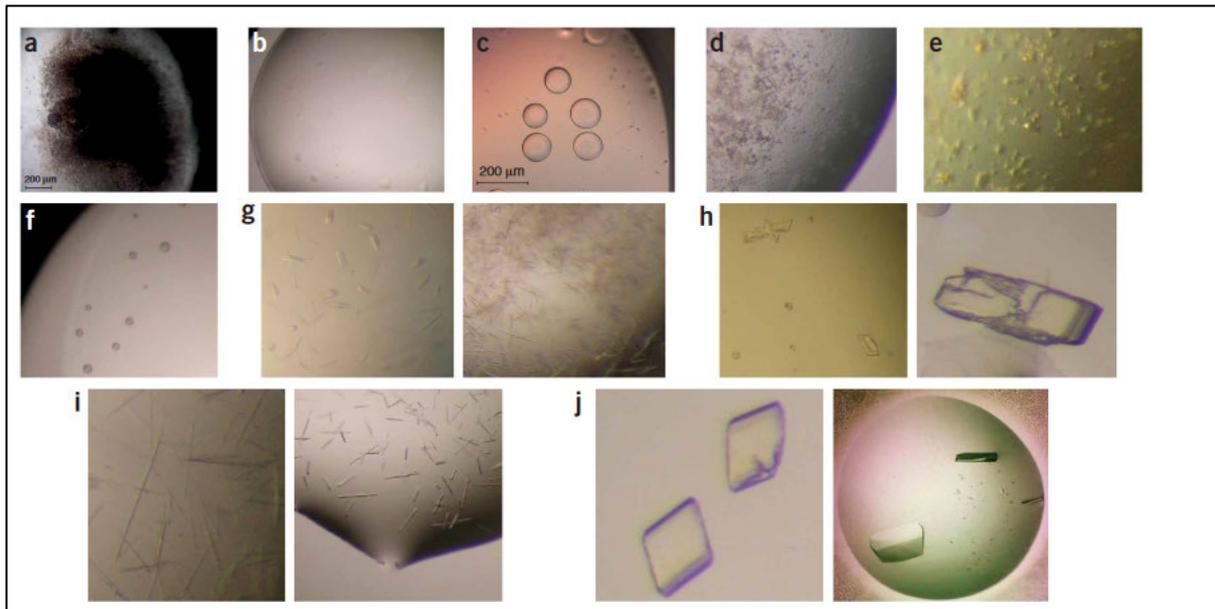


Figure 35 : Exemple des différents résultats obtenus à l'issu d'un criblage de cristallogénèse.

Les résultats sont classés selon la qualité du résultat obtenu, par ordre alphabétique.

Les cristaux du type de ceux illustrés en Figure 35j sont ceux dont la qualité permet d'obtenir des clichés de diffraction des rayons X suffisamment exploitables pour espérer résoudre la structure de la macromolécule étudiée.

A partir des 864 puits de criblage, nous avons obtenu trois types de cristaux, apparus entre le 43^{ème} jour et le 89^{ème} jour d'incubation à 18°C. Ces trois cristaux ont été jugés intéressants car ils présentent une apparence régulière et sont isolés les uns des autres. Ils ont été analysés par diffraction aux rayons X (Figure 36). En parallèle de l'analyse, un Western blot a été réalisé les cristaux dissous afin de déterminer s'ils contiennent les deux protéines formant le complexe ou s'ils proviennent de la cristallisation de l'un ou l'autre des partenaires.

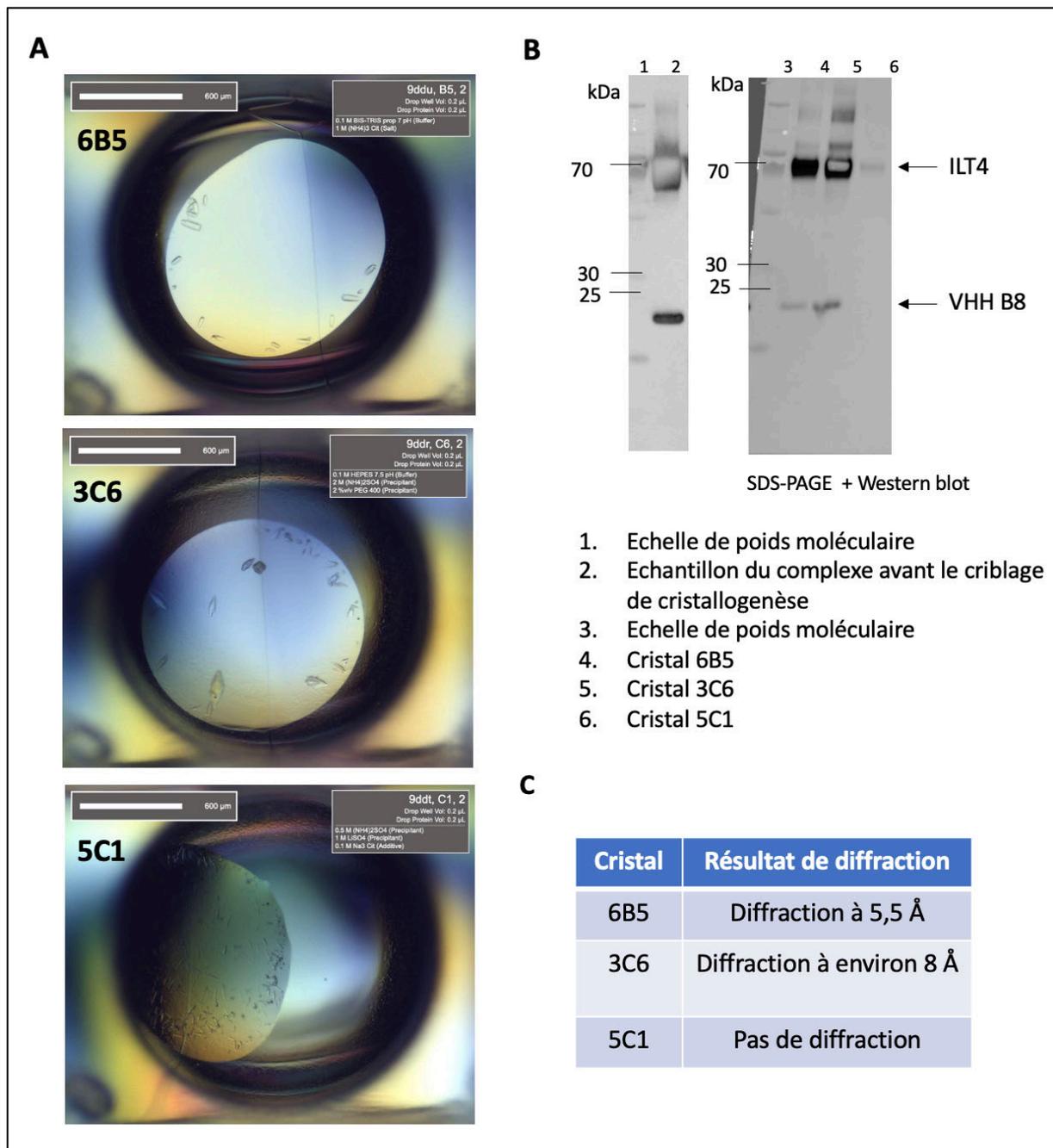


Figure 36 : Analyse des cristaux formés lors du 1^{er} criblage de cristallogénèse

A. Visualisation au microscope des cristaux. Photos réalisées par le microscope automatisé RockImager aux jours 43 (pour 3C6 et 5C1) et 89 (pour 6B5) après incubation dans les plaques de cristallogénèse.

B. Analyse de la composition protéique des cristaux. Les cristaux 5C1 3C6 et 6B5 ont été extraits des puits de cristallogénèse et dissout dans l'eau avant analyse par SDS-PAGE et Western blot, révélation avec un anticorps anti- HisTag HRP.

Pour l'analyse par western blot des cristaux, nous avons utilisé l'anticorps anti HisTag HRP, car l'étiquette est présente sur ILT4-ECD et B8. On peut ensuite identifier chaque protéine grâce à leur différence de poids moléculaire, comme présenté dans le puits 2 de la Figure 36 B. Dans l'échantillon du complexe analysé avant le criblage, on observe deux bandes à 70 kDa et environ 20 kDa, correspondant à l'ILT4-ECD et B8, respectivement. On observe les mêmes bandes dans les puits correspondant aux cristaux 6B5 et 3C6, ce qui nous permet de confirmer que ces cristaux sont bien formés par le complexe. Pour le cristal 5C1, le résultat ne nous permet pas de conclure car la taille du cristal n'était pas suffisante pour générer une quantité suffisante de protéine à analyser.

Les résultats de l'analyse de la diffraction des rayons X des trois cristaux sont résumés dans le tableau C de la figure 36. Les cristaux 6B5 et 3C6 diffractent, respectivement, à 5.5 Å et 8 Å, mais le cristal 5C1 n'a donné aucun résultat vu sa taille (< 5µm). Nous avons pu collecter un jeu de donnée sur le cristal 6B5. Ceci nous a permis de connaître son groupe d'espace ($I4_1$) et les dimensions de sa maille ($a=132,8$ Å, $b=132,8$ Å, $c=59,3$ Å et $a=b=c=90^\circ$). Le Calcul du coefficient de Matthews (<https://csb.wfu.edu/tools/vmcalc/vm.html>) suggère que nous avons un complexe par unité asymétrique. Malheureusement nos collaborateurs n'ont pas pu résoudre la structure avec ce jeu de données car la résolution (5.5 Å) n'est pas suffisante. Ces premiers résultats sont cependant très encourageants, car nous avons identifié des conditions dans lesquelles le complexe cristallise. Il sera possible par la suite de réaliser des expériences d'optimisation et de congélation de ces cristaux pour améliorer leurs qualités de diffraction des rayons X.

6) Conclusions et perspectives de la deuxième partie expérimentale

Déterminer la structure cristalline de l'interaction entre ILT4 et le VHH B8 permettrait d'obtenir des informations sur le mode d'action du VHH, comme cela a été décrit pour un anticorps ciblant le point de contrôle immunitaire PD1, l'anticorps tislelizumab approuvé par les autorités de santé chinoises. La structure du fragment Fab de l'anticorps en complexe avec PD-1 a été résolue (S. H. Lee et al. 2020). L'anticorps se lie à PD-1 d'une manière similaire à l'interaction du récepteur avec PD-L1, entrant directement en compétition avec le ligand, contrairement à deux anti-PD1 actuellement utilisés en thérapie, nivolumab et pembrolizumab, dont les structures en complexe avec PD-1 ont été résolues par d'autres groupes (Horita et al. 2016) (Lee et al. 2016) (Lee et al. 2017) (Na et al. 2017). En effet, la fonction antagoniste de ces deux anticorps est liée à la reconnaissance d'épitopes sur PD-1 en dehors du site de liaison avec PD-L1. Ces comparaisons de mode d'inhibition permettent d'apporter des informations supplémentaires sur les modes d'action des anticorps bloquant et de déterminer des axes d'amélioration de ces anticorps.

Dans cet optique, nous avons réalisé dans cette étude un criblage de cristallogénèse, qui nous a permis d'identifier des conditions favorables à la formation de cristaux du complexe formé par le VHH-B8 et l'ILT4-ECD. Les résultats obtenus à l'issue du premier criblage nous ont permis d'identifier des conditions dans lesquels le complexe cristallise, impliquant que la nature de notre protéine et la qualité de l'échantillon obtenus grâce à notre procédé de production et de purification sont compatibles avec la formation de cristaux.

Nous avons mis en place plusieurs approches pour optimiser la qualité de diffraction des cristaux obtenus, en faisant varier deux paramètres : (i) l'optimisation des conditions de cristallogénèse (additifs, variation de la concentration du complexe) à partir des trois conditions identifiées lors du premier criblage et (ii) la cristallogénèse d'un nouveau complexe utilisant la protéine ILT4-ECD produite en cellules d'insecte. Cette dernière approche vise à réduire le niveau de glycosylation de la protéine ILT4, car les motifs de glycosylation peuvent interférer avec le processus de cristallisation. Ces motifs de glycosylation font partie des modifications post-traductionnelles présentes dans les cellules eucaryotes, cependant le niveau de complexité de ces structures est moindre dans les cellules d'insecte que dans les cellules de mammifères. Comme il existe des anticorps dont l'épitope se situe sur un motif de glycosylation, il était indispensable de vérifier que le VHH B8 ne reconnaît pas un épitope

glycosylé, ce qui pourrait empêcher la formation du complexe avec l'ILT4 produit en cellules d'insecte. Nous avons donc analysé la capacité du VHH B8 à reconnaître l'ILT4-ECD après déglycosylation par des enzymes de clivage des motifs de polysaccharides. Les résultats de déglycosylation sont détaillés dans la partie Résultat annexe 3. Brièvement, nous avons obtenu des données préliminaires qui suggèrent que le VHH B8 ne reconnaît pas un épitope glycosylé, car il se fixe en ELISA de façon similaire à l'ILT4-ECD produit en cellules de mammifère avant et après déglycosylation (en condition non dénaturante).

Un deuxième criblage a donc été réalisé, à partir d'une nouvelle production d'ILT4-ECD en cellules Expi293™ et de B8 selon les mêmes protocoles. Deux concentrations du complexe ont été utilisées pour réaliser les gouttes, les 7 premiers kits (voir matériel et méthode) ont été de nouveau utilisés. Les trois conditions ayant donné des cristaux lors du premier screening ont été répétées manuellement, avec l'ajout de certains additifs dans le but d'améliorer la qualité des cristaux obtenus.

La production de la protéine ILT4-ECD en cellules d'insecte a été mise au point par François Dejardin, ingénieur de recherche à la plateforme de Production et de Purification des Protéines de l'Institut Pasteur.

L'analyse en western blot des échantillons intracellulaires et de surnageant de culture ont permis de valider la présence de la protéine. On observe dans la partie intracellulaire deux bandes de poids moléculaire à environ 50 kDa et 55 kDa, et dans le surnageant seulement la bande à 55 kDa. Il est probable que cette bande corresponde à la protéine mature, après les modifications post-traductionnelles. Le niveau de glycosylation de cette protéine est donc réduit par rapport à la protéine produite en cellules Expi293™, dont le poids moléculaire est de 70 kDa. Il semblerait cependant que la protéine ILT4-ECD produite en cellules d'insecte ne soit pas stable, car des agrégats protéiques sont observables à l'œil nu dans les échantillons après purification par chromatographie d'affinité. Nous avons réussi à purifier par SEC le complexe « ILT4-ECD insecte » avec B8, malgré un rendement de purification très faible de l'ordre de 30%. La quantité du complexe obtenu a malgré tout permis de réaliser un criblage réduit à 192 conditions, et le suivi de la formation des cristaux est en cours.

Discussion

Les immunothérapies utilisant des anticorps monoclonaux bloquant des points de contrôles immunitaires (PCI), qui reprogramment les capacité antitumorales du système immunitaire, sont aujourd'hui une des premières lignes dans les traitement anticancéreux (Tartour et al. 2011). Ces avancées ont apporté des solutions thérapeutiques à de nombreux patients, cependant le taux de réponse à ces thérapies est encore faible, estimé entre 10% à 30% pour les thérapies anti-PD-1 et PD-L1 (Ribas and Wolchok 2018) (He and Xu 2020) et il est maintenant clairement établi que l'efficacité des thérapies bloquant des PCI repose en partie sur la capacité à cibler un large spectre de ces points de contrôle, et de les combiner avec d'autres immunothérapies ou thérapies anticancéreuses conventionnelles (Drake 2012).

Les IgG conventionnelles sont aujourd'hui le format principalement utilisé en thérapie à base d'anticorps monoclonaux (Diallo et al. 2019). L'essor des techniques d'ingénierie moléculaire des protéines ont permis d'imaginer de nouveaux formats d'anticorps possédant des propriétés désirées, par exemple des anticorps ciblant différentes molécules (Chames et al. 2009; Chanier and Chames 2019). La découverte des anticorps homodimériques de camélidés, à la fin des années 1980 par Warom et al., à partir desquels sont générés des domaines d'anticorps simple chaîne ((HamersCasterman et al. 1993) a apporté de nouvelles possibilités au domaine de l'ingénierie des anticorps. En effet, ces petits anticorps, nommés VHH ou Nanobody®, possèdent les mêmes capacités de reconnaissance des antigènes que les anticorps classiques, tout en étant plus faciles à produire, plus solubles et plus stables (Lafaye and Li 2018) (Muyldermans 2013). L'avantage majeur de ces VHH en immunothérapie réside dans leur facilité d'ingénierie, due à leur structure simple chaîne, qui permet de concevoir des molécules aux propriétés multiples, qui conservent une structure relativement simple et un poids moléculaire plus faible que les IgG.

Dans ce contexte, nous avons développé un anticorps, à partir de la technologie des VHH, capable d'inhiber le récepteur ILT4, un récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes impliqué dans la régulation du système immunitaire en conditions physiologiques, et dans l'échappement tumoral au système immunitaire dans le microenvironnement tumoral (Gao et al. 2018). Ce VHH, nommé B8, possède une forte affinité et spécificité pour l'ILT4, dont il bloque l'activation par deux de ses ligands, la molécules de CMH de classe I non classique HLA-G, et

l'Angiopoïétine like-2 (ANGPTL2). L'antagonisme d'ILT4 par le VHH B8 empêche la différenciation *in vitro* de macrophages vers un phénotypes pro-tumoral. Les formats bivalents de ce VHH, générés par ingénierie moléculaire, possèdent en outre des capacités bloquantes augmentées par rapport au monomère.

Le mode d'action de l'effet antagoniste du VHH B8

La deuxième partie expérimentale de notre étude a porté sur la cristallisation du VHH-B8 complexé à l'ILT4, afin de résoudre la structure par diffraction des rayons X et d'ainsi déterminer l'épitope reconnu sur le récepteur, et le mode d'inhibition de notre VHH. En attendant d'obtenir des résultats de diffraction exploitables, et grâce aux données obtenues dans l'étude de caractérisation du VHH B8, il est possible de poser plusieurs hypothèses concernant le mode d'action de son effet antagoniste.

Tout d'abord, bien que l'affinité d'ILT4 pour HLA-G soit supérieure, ILT4 est un récepteur pour tous les CMH de classe I. Des études ont rapporté que l'interaction avec ces molécules peut avoir lieu en *trans* c'est-à-dire entre un récepteur ILT4 et un CMH-I exprimés par deux cellules différentes, ou en *cis* à la surface d'une même cellule (van der Touw et al. 2017). Nous avons validé dans notre modèle que les macrophages M2 expriment les CMH-I (voir Résultats Annexe 4), suggérant une possible interaction avec ILT4 à la surface de ces cellules. Ce mode d'action est également avancé par Chen et al (2018) pour expliquer l'effet biologique observé sur les macrophages cultivés en présence d'un anticorps antagoniste d'ILT4. Dans notre modèle de polarisation des macrophages, l'absence des ligands HLA-G6-Fc ou ANGPTL2 implique que le mode d'action de B8 dans ce modèle cellulaire passe par l'inhibition de l'interaction d'ILT4 avec un autre de ses ligands, et nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agit des CMH-I exprimés à la surface des macrophages. Afin de confirmer ce mode d'action dans notre modèle, nous pourrions dans une prochaine expérience utiliser un anticorps bloquant les CMH-I afin d'observer si l'on obtient les mêmes effets sur le phénotype cellulaire qu'avec le VHH B8.

Ensuite, l'absence de réactivité croisée entre B8 et ILT2 nous indique qu'il reconnaît un épitope uniquement présent sur ILT4. Nous avons montré que B8 est capable d'inhiber l'interaction entre HLA-G1, G6 et l'ANGPTL2, et on suppose également avec les CMH I classiques. L'analyse

des séquences protéiques de l'ILT4 et l'ILT2 montre 80% d'homologie, avec des mutations ponctuelles dans tous les domaines extracellulaires. Cependant l'analyse de la structure primaire linéaire apporte des informations incomplètes sur la structure des récepteurs ILT2 et ILT4. Les structures tridimensionnelles des récepteurs ILT4 et ILT2 ont été obtenues (Kuroki et al. 2019; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al. 2006) (Q. Wang et al. 2019) ce qui a permis d'identifier les sites d'interactions entre HLA-G, CMH-I et l'ILT4. Le domaine de reconnaissance d'ILT4 par l'ANPGTL2 a également été défini et se situe majoritairement dans les domaines D1-D2 comme pour les CMH-I (Deng et al. 2014).

Shiroishi *et al* ont résolu la structure cristalline de l'ILT4 en complexe avec HLA-G1 sans la présence de β 2-microglobuline (β 2m) en 2006, et l'ont comparé avec la structure du complexe HLA-A2/ILT2. Ils ont identifié les deux sites sur les récepteurs ILTs impliqués dans l'interaction avec les CMH-I, et il y a recouvrement entre les sites d'interaction de ILT2 avec HLA-A2 et ILT4 avec HLA-G. Les deux récepteurs reconnaissent un motif d'acide aminé au niveau du domaine alpha3 des molécules CMH-I (site 2) et sur la β 2m (site 1). Cependant, ILT4 interagit majoritairement avec une boucle de trois acides aminés hydrophobes du domaine alpha3 de HLA-G et peu avec la β 2m, ce qui explique que la présence de β 2m pour sa fixation à HLA-G ne soit pas nécessaire. Le site 1 d'interaction avec la β 2m se situe sur le domaine D2 d'ILT4, et le site 2 d'interaction avec alpha3 sur le domaine D1. Le site 2 d'interaction des domaines D1 d'ILT2 ou ILT4 avec alpha3 des CMH-I varie d'un acide aminé, W83 sur ILT4 et Y76 sur ILT2. Étant donné que B8 ne reconnaît pas ILT2, et si on estime qu'il entre en compétition direct avec la fixation pour HLA-G, on peut poser l'hypothèse que l'épitope reconnu par B8 implique l'acide aminé W83. Afin d'affirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait possible de produire une protéine ILT4 recombinante mutée pour cet acide aminé puis d'évaluer l'affinité de B8 pour cette construction. C'est la méthode qu'ont employé Deng et al en 2014, qui ont réalisé des études pour déterminer le site d'interaction entre la protéine ANPGTL2 et l'ILT4. Pour cela, ils ont généré des protéines ILT4 mutées pour certains acides aminés, et ont identifié que les sites d'interactions se situent dans les domaines D1, D2 et D4. Cependant ils n'ont pas observé de compétition entre l'ANPGTL2 et HLA-G pour la fixation à ILT4, ce qui suggère que les deux ligands reconnaissent des épitopes différents. Cependant, il existe tout de même un recouvrement entre leurs sites de fixation, ou ils requièrent une conformation d'ILT4 similaire, car certaines mutations du récepteur entraînent l'inhibition de la fixation des deux ligands. Cependant, ces expériences nous apporteraient des informations incomplètes concernant la

structure tridimensionnelle de l'interaction entre le VHH B8 et ILT4. Ceci soulève l'importance de l'étude que nous réalisons actuellement afin d'obtenir la structure cristalline du VHH B8/ILT4, et de déterminer avec précision l'épitope reconnu par le VHH.

Vers le développement clinique du VHH B8 en immunothérapie

Malgré les premiers succès de l'immunothérapie ciblant les PCI CTLA-4 et PD-1 et PD-L1 surtout dans le traitement des mélanomes jusqu'alors incurables, certains défis restent à relever pour permettre de traiter plus de patients. Toutefois, la résistance aux traitements anti-PCI actuel reste une limitation majeure qui restreint l'efficacité des traitements. En effet, le taux de réponse global des patients aux thérapies anti-PD1/PD-L1 est de 10% à 30% selon le type de cancer, incluant les résistances primaires, c'est-à-dire des patients ne répondant pas au traitement et les résistances acquises, ainsi que les patients chez qui le bénéfice thérapeutique diminue au cours du temps (Seidel et al. 2018). Les mécanismes de résistance peuvent être liés à l'absence de l'expression de CTLA-4 ou PD-1/PD-L1 chez les patients, chez qui ces thérapies ne sont donc pas utilisées, mais aussi à la diminution de cette expression et à l'apparition de nouveaux mécanismes d'échappement par immunoediting (Dunn et al, 2004). Le développement du VHH B8 antagoniste d'ILT4, dans le but de reprogrammer le compartiment myéloïde immunosuppresseur, s'inscrit donc dans cette stratégie de multiplier les points de contrôles immunitaires ciblés en immunothérapies.

Adapter le format VHH monomérique à une application thérapeutique

La pénétrabilité des anticorps dans la tumeur solide suscite de nombreuses discussions. Comme abordé dans l'introduction (partie III. 2. h Pénétration des tissus), la théorie de la meilleure capacité de diffusion dans les tissus d'un petit format d'anticorps suppose une meilleure capacité des VHH à pénétrer les tumeurs. En théorie, les petits formats tels que les VHHs ont des taux de transports à travers les vaisseaux sanguins et dans la tumeur augmentés par rapport aux IgG. Cependant, en pratique, la longue présence des anticorps dans le plasma améliore leur diffusion tumorale et est indispensable pour un produit à des fins thérapeutique (Kitten and Martineau 2019). Afin de maintenir une concentration en circulation suffisante

d'anticorps ayant une faible demi-vie, il est possible de l'administrer en perfusion intraveineuse en continu pendant plusieurs semaines, avec un système portatif (Chames and Wurch 2019). C'est le cas pour les thérapies utilisant l'anticorps blinatumab pour le traitement de lymphomes, un anticorps bispécifique composé d'un scFv ciblant CD19 et d'un scFv anti-CD3 (Viardot et al. 2016) . La faible demi-vie a l'avantage dans ce cas de permettre l'arrêt rapide du traitement en cas d'effet secondaire, l'anticorps étant éliminé en quelques heures. La relation entre la taille de macromolécules et la pénétration et rétention tumorale a été étudié grâce à des DARPin (Design Ankyrin Repeat protein), de petites protéines possédant une forte affinité pour HER2 de l'ordre du pM (Zahnd et al. 2010). Les auteurs ont évalué la capacité de trois macromolécules possédant la même affinité pour HER2 à pénétrer une tumeur solide dans un modèle murin de xénogreffes : un monomère de DARPin anti-HER2, un hétérodimère de ce DARPin associé à un autre DARPin ne reconnaissant pas la cible et un DAPRin anti-HER2 associé à 20kDa de PEG. 24h après l'injection, le ratio ID/masse, qui traduit la quantité de molécule ayant pénétré la tumeur sur la totalité de la dose injectée, est de 8% pour le monomère contre 1.8% pour l'hétérodimère et 13% pour le DARPin-PEG, suggérant que la molécule de plus haut poids moléculaire est mieux retenue dans la tumeur.

On voit bien que la question de la pharmacocinétique, et donc du format du VHH utilisé, est centrale dans l'élaboration d'une thérapie, particulièrement contre les tumeurs solides. Les propriétés attendues d'un anticorps anti-PCI sont de pénétrer les tissus tumoraux pour atteindre la cible intra-tumorale et avec une très forte spécificité pour le tissu tumoral sans affecter les tissus sains environnants.

Nous avons conçu différents formats d'anticorps à partir du VHH B8, mono et dimériques, et notamment par la fusion du VHH à une région Fc d'IgG1 humain. Ce format a été étudié tout au long de cette thèse et comparé au format parental, pour différents paramètres comme l'affinité ainsi que sa fonction biologique *in vitro*.

Les récepteurs ne sont pas des molécules isolées à la surface d'une cellule mais peuvent se regrouper en clusters. Il a été montré que la formation de ces clusters de récepteurs à la surface des cellules peut entraîner leur activation (Heldin 1995). Ainsi, l'activation d'ILT4 par formation de cluster a été rapportée. Grâce à un modèle cellulaire exprimant un récepteur ILT4 chimérique dont l'activation entraîne l'expression de la GFP, Deng *et al* ont montré en 2014

que des ligands oligomérisés (ici les ANGPTLs), des anticorps anti-ILT4 polyclonaux ou le clone 42D1 immobilisés à la surface de puits de culture, entraînent la formation de clusters d'ILT4 à la surface des cellules. Ce cluster entraîne l'activation de la voie de signalisation d'ILT4 et l'expression de la GFP. De plus, la meilleure capacité d'activation d'ILT4 et ILT2 par les formes oligomériques de HLA-G par rapport aux formes monomériques a également été rapportée (HoWangYin et al. 2012) (Boyson et al. 2002) (Shiroishi, Kuroki, Ose, et al. 2006) (Favier et al. 2011). Ceci peut s'expliquer par la plus grande affinité de ces oligomères pour les récepteurs, ou par leur capacité à engager plusieurs récepteurs à la surface d'une cellule. Dans le cadre d'une thérapie bloquante ciblant un récepteur, on doit donc s'assurer que l'engagement du récepteur par un anticorps spécifique n'entraîne pas la formation de cluster et son activation. Le test cellulaire (Promega) réalisé au cours de cette étude, liant l'état d'activation de l'ILT4 à l'activité de l'enzyme luciférase, nous permet de répondre à cette question. En effet, nous avons observé que les deux formats du VHH-B8 dimériques entraînent l'inhibition de l'activation d'ILT4, de la même manière que le format de B8 monomérique. Nous en concluons qu'un format de VHH-B8 bivalent n'entraîne pas l'activation d'ILT4. Ce constat est également vrai avec les deux anticorps anti-ILT4 développés par Merck Sharp & Dohme Corp. (MSD) et Jounce Therapeutic, qui sont des IgG4 conventionnelles, et les études rapportent l'inhibition d'ILT4 par ces anticorps (Siu et al. 2022) (Cohen et al. 2019). On peut donc penser qu'un niveau de multimerisation supérieur à deux est nécessaire pour former des clusters à la surface de la cellule et activer l'ILT4, et que le format bivalent du VHH B8 est donc applicable à une thérapie bloquante.

L'anticorps VHH B8-Fc développé vise à bloquer la fonction immunosuppressive du récepteur ILT4 exprimé par les macrophages M2, et non à détruire ces cellules immunitaires. On souhaite donc éviter les effets ADC et ADCC propres aux IgG1. L'isotype IgG4 présente une affinité faible pour les FcR3a, exprimés principalement par les macrophages et impliqués dans la phagocytose, et il est communément décrit comme l'isotype non activateur du système immunitaire (Kretschmer et al. 2017). En immunothérapie, cet isotype est donc particulièrement intéressant pour les stratégies d'inhibition de points de contrôles immunitaires afin de reprogrammer une population cellulaire sans provoquer de cytotoxicité. Les deux anticorps anti-PD1 pembrolizumab et nivolumab sont des IgG4, tout comme les deux anticorps anti-ILT4 développés par MSD et Jounce Therapeutics.

L'affinité de l'anticorps pour sa cible est également un paramètre qui influence la capacité des anticorps à pénétrer dans les tumeurs solides. En effet, la très forte affinité des anticorps est considérée comme une propriété importante dans une thérapie bloquante, cependant, elle peut aussi entraîner ce qu'on appelle l'effet barrière du site de fixation (binding site barrier effect en anglais) : l'anticorps se fixe sur sa cible moléculaire exprimée par les cellules avec lesquels il est en contact en premier, généralement en périphéries de la tumeur, ce qui limite sa diffusion dans le centre de la tumeur (Xenaki et al. 2017). En raison de l'effet barrière décrit précédemment, on peut se demander si le format dimérique de VHH B8-Fc, bien que possédant une capacité bloquante plus forte que le monomère, serait sujet à cet effet barrière en raison de son avidité augmentée pour ILT4. Dans ce cas, le format monomérique, lui aussi capable d'inhiber l'interaction d'ILT4 avec ses ligands, serait plus pertinent. Des études *in vivo* seraient nécessaires pour comparer la diffusion dans la tumeur des différents formats du VHH B8.

L'entreprise Ablynx (Sanofi), qui développe actuellement des VHH multimériques pour l'application en immunothérapies emploie une autre stratégie pour augmenter la demi-vie des VHH différente de la fusion à une région Fc (Hoefman et al. 2015). Leur dimère constitué d'un VHH anti-IL6R et d'un VHH anti-albumine a un faible poids moléculaire de 26 kDa mais une demi-vie de 6,6 jours (Van roy et al, 2015). Ce format de VHH conserve l'avantage de la petite taille, inférieure à 60 kDa mais a une demi-vie augmentée à plusieurs jours, grâce à leur liaison avec l'albumine, la protéine majoritaire circulant dans le sang. Un autre avantage de ces constructions dépourvues de région Fc réside dans les procédés de production en bactéries *E. coli*, moins coûteux et plus rapides à mettre en place que les productions en cellules de mammifères de type CHO, majoritairement utilisés pour produire les lots cliniques d'anticorps (Owczarek et al. 2019) (Joubert et al. 2019). La génération d'un dimère constitué du VHH anti-ILT4 et d'un VHH anti-albumine (environ 30 kDa) serait également une stratégie pertinente pour l'application *in vivo*. La structure poreuse des vaisseaux sanguins anormaux entraîne l'accumulation de sang dans la tumeur solide (Merlot, Kalinowski, and Richardson 2014). En plus d'augmenter la demi-vie du VHH B8 anti-ILT4, la fusion à un VHH anti-albumine permettrait donc également d'augmenter la concentration du nano-anticorps thérapeutique dans la tumeur.

Considération sur les effets secondaires immunitaires dans le cadre de la thérapie utilisant le VHH-B8

Dans le cadre de la thérapie proposée anti ILT4, l'anticorps B8-Fc-IgG4 ou un VHH B8 couplé à un VHH anti-albumine n'aura pas de fonction ADCC associées, donc pas de déplétion des cellules tolérogènes du TME ni de cytotoxicité directe sur les cellules immunitaires circulantes. Le principe de la thérapie se base donc sur l'inhibition de la voie de signalisation via ILT4 pour reprogrammer les cellules immunitaires tolérogènes. Cependant, comme pour les thérapies PD-1/PD-L1 et CTLA-4, des effets secondaires de types allergies et auto-immuns peuvent avoir lieu à la suite de la levée de la tolérance périphérique par l'inhibition de la voie de signalisation ILT4 sur les autres cellules myéloïdes non impliquées dans le TME. Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour adresser cette question. Tout d'abord, on pourrait estimer que la toxicité sera limitée, compte tenu de la faible expression d'ILT4 en dehors des cellules myéloïdes et de sites immuno-privilegiés. En effet, les données de séquençage ARN (base de données Human Protein Atlas) réalisés sur des tissus sains montrent une expression d'ILT4 fortement limitée au thymus contrairement à PD-L1 exprimé dans de nombreux tissus sains. On s'attend donc à moins d'effet « on target off tumor » qu'avec les thérapies anti-PD-L1. Ce type de toxicité, qui découle de la fixation spécifique d'anticorps thérapeutiques sur leur cible moléculaire mais en dehors des tissus tumoraux, est une des limitations en immunothérapies. Les premiers résultats en essais cliniques de phase I obtenu par MSD montrent que la toxicité liée à la thérapie anti-ILT4, chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (Siu et al. 2022) est modérée aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec l'anticorps Pembrolizumab (anti PD-L1).

Par ailleurs, des stratégies ont été développées pour restreindre la présence de l'anticorps au site tumoral, et ainsi limiter la toxicité systémique tout en augmentant la biodisponibilité de la molécule dans les tissus cibles. Par exemple, les immunothérapies intra-tumorales consistent à injecter directement dans la tumeur la molécule immunomodulatrice ou un vecteur viral permettant son expression (Champiat et al. 2021). Du fait de la structure simple chaîne et l'absence de glycosylation des VHH, ce qui les rend beaucoup plus facile à produire que les IgG conventionnelles, les VHH semblent être d'excellents candidats pour ces approches de synthèse *in situ* par injection d'ARNm ou de vecteurs lentiviraux.

Un autre paramètre qui pourrait entraîner une toxicité non souhaitée est la potentielle réactivité croisée du VHH B8. En effet, la grande homologie de séquence entre les récepteurs de la famille des ILTs rend possible une réactivité croisée avec les VHH anti-ILT4. L'homologie de séquence entre ILT4 et ILT1, ILT2, ILT3 et ILT5 est respectivement de 80%, 81%, 50% et 64% (alignement UniProtKB référence Q8NHJ6 et O75022-1).

L'objectif de notre stratégie thérapeutique bloquant l'ILT4 est de cibler soit le compartiment myéloïde du microenvironnement tumoral, soit des cellules tumorales exprimant ILT4. Bien que les quatre autres récepteurs de la famille des ILTs humain aient été moins étudiés, ils jouent également un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Par exemple, le récepteur ILT3 est exprimé par les monocytes et les cellules dendritiques (Manavalan et al. 2003) et participe comme ILT4 aux fonctions tolérogènes de sous population de cellules dendritiques. L'entreprise Merck a d'ailleurs développé un anticorps bloquant ce récepteur ILT3 qui induit la reprogrammation des MDSCs (Singh et al. 2021). Les résultats de l'essai clinique de phase I montrant cependant des effets antitumoraux limités (Gutierrez et al. 2021). Un anticorps reconnaissant ces récepteurs inhibiteurs en plus de l'ILT4, pourrait entraîner une toxicité immunitaire plus importante. De plus, la famille des ILTs comprend également des récepteurs activateurs, comme le récepteur ILT1 (Colonna et al. 2000). Un anticorps bloquant ces récepteurs activateur sur les cellules myéloïdes aurait donc l'effet inverse de celui recherché dans une thérapie de reprogrammation des CPA. Pour le développement clinique du VHH B8, il serait donc intéressant de vérifier sa spécificité par rapport aux autres ILTs. Ces études ont d'ailleurs été réalisées par Jounce Therapeutics (Patent US 2019/0194327 A1) et MSD (Patent US 2018/0298096 A1) avec leur anticorps anti-ILT4, montrant qu'ils n'ont pas de réactivité croisée avec les autres membres de la famille des ILTs.

Parmi les six VHH testés dans notre étude, seul le VHH B8 ne reconnaît pas ILT2 (Figure 29, Résultats). On peut donc penser que les régions les plus immunogènes du récepteur ILT4 sont des régions partagées avec l'ILT2, et que le VHH B8 reconnaît un épitope spécifique de l'ILT4, non partagé par les autres récepteurs de cette famille. Afin de confirmer cette hypothèse, la lignée cellulaire LCL sur laquelle nous avons testé la réactivité croisée des VHH pour ILT2 pourrait être également un bon modèle d'étude de la réactivité croisée avec ILT3. En effet, elle a été décrite comme exprimant à la fois ILT2 et ILT3 (LeMaout et al. 2005). Étant donné que

le VHH B8 ne se fixe pas à la surface de ces cellules, on peut supposer qu'il ne reconnaît pas ILT3. L'expression d'ILT3 à la surface de la lignée cellulaire LCL pourra être confirmée par un marquage avec un anticorps commercial spécifique d'ILT3. Pour les deux autres récepteurs, des lignées transduites pourraient être générées.

Utilisation du VHH B8 monomérique comme test rapporteur en diagnostique pour l'imagerie *in vivo*

Un certain nombre de biomarqueurs sont en cours d'identification et analysés dans le but de prédire la réponse à un traitement par anticorps bloquant ; par exemple, le taux d'expression de PD-L1, l'instabilité génétique, le taux de mutation tumoral, l'infiltrat tumoral en lymphocytes T (Walk et al. 2020). Un des axes d'optimisation des immunothérapies réside dans la meilleure compréhension de la bio-distribution de la cible, sa saturation par l'anticorps thérapeutique ou encore l'effet de l'affinité de l'anticorps sur sa distribution dans la tumeur (Fruhworth et al. 2018). Par exemple, PD-L1 est utilisé comme biomarqueur pronostic de la réponse aux traitements anti-PD1. Notamment, des études cliniques montrent une meilleure efficacité du traitement de mélanomes métastatiques chez les patients avec un taux d'expression de PD-L1 intra tumoral élevé (Daud et al. 2016). Ces analyses reposent majoritairement sur des marquages de tissus tumoraux par immunohistochimie (IHC). La récupération de ces tissus nécessite une intervention chirurgicale invasive. Pour ce type de diagnostic, les informations obtenues à un temps T sont limitées, tandis que l'expression des points de contrôles immunitaire est dynamique, variant donc au cours du développement tumoral, à la suite d'un traitement et à cause de l'hétérogénéité de la tumeur. L'imagerie *in vivo* présente de nombreux avantages, car elle permet de localiser la cible thérapeutique dans le corps entier, de façon non invasive, et de suivre la réponse à un traitement (Hettich et al. 2016).

Le format parental monomérique du VHH B8 n'est pas utilisable en thérapie, mais serait pertinent pour le diagnostic et l'imagerie *in vivo*. En effet, la faible demi-vie du format monomérique des VHH est un réel atout dans cette application (voir partie III, 2. E de l'introduction pour plus de détails). En effet, l'élimination très rapide des VHH circulant permet de réduire considérablement le bruit de fond. D'un point de vue pratique pour les patients et les médecins, l'analyse par imagerie avec un VHH couplé à un agent de contraste peut être réalisée le jour de l'injection, contrairement aux IgG conventionnelles, qui nécessitent de

réaliser l'imagerie 24 à 48h après injection (Bannas et al. 2015). Le marquage d'ILT4 par le VHH B8 pourrait permettre, donc, d'apporter des informations sur l'infiltrat en cellules myéloïdes ILT4+ dans la tumeur, ainsi que l'expression d'ILT4 ou non par les cellules tumorales. Lors des études cliniques, l'analyse de la réponse à l'immunothérapie anti-ILT4 en fonction du taux de cellules immunitaires ILT4+ infiltrées avant, pendant et après traitement pourrait apporter des informations sur le fonctionnement de la thérapie et de définir des critères d'inclusion des patients par la suite ou prédire les taux de réponses au traitement.

Les thérapies combinatoires avec l'immunothérapie anti-ILT4

L'efficacité des monothérapies à anticorps bloquant anti PCI est limitée en partie à cause de la résistance, innée ou acquise, notamment due à l'expression d'autres PCI dans la tumeur. Il apparaît donc clair que l'efficacité des thérapies bloquant des points de contrôle immunitaire repose sur la capacité à cibler un large spectre de ces points de contrôle, seuls, en combinaison ou sur différentes lignes de traitement.

Les nouveaux anticorps bloquants sont donc souvent testés en combinaison avec un anticorps anti PD1/PD-L1 ou CTLA-4, ou avec un autre type de traitement comme la radiothérapie, la chirurgie ou un autre PCI. Cependant, les effets secondaires des combinaisons de molécules sont souvent plus forts, notamment les combinaisons des chimiothérapies avec des anti-PD1/PD-L1 ont montré 97.7% d'effets secondaires, le plus haut recensé (Wu et al. 2022).

Pour des applications en combinaison, les VHH possèdent des avantages majeurs par rapport au IgG conventionnelles : leur facilité d'ingénierie par biologie moléculaire, leur petite taille et leur grande stabilité, qui permettent de concevoir des formats d'anticorps multi-spécifiques conservant un faible poids moléculaire et facile à produire comme protéines recombinantes.

Ainsi, il pourrait être possible de développer un VHH bispécifique anti-ILT4 et ciblant un autre point de contrôle immunitaire exprimé à la surface des CPA, ou un autre facteur pro-tumoral.

Le format d'anticorps LiTCO, développé par l'entreprise Leadartis, est un très bon exemple d'utilisation des VHH en bithérapie. Les auteurs ont associé en tandem un scFv et un VHH, spécifiques de l'EGFR et de 4-1BB, un récepteur activateur des lymphocytes T, dans le but de restreindre l'activation aux LT infiltrés dans la tumeur, et ainsi limiter les effets secondaires immunitaires très forts de cette thérapie agoniste (Hangiu et al. 2022). Le tandem scFv/VHH

est associé à une protéine d'albumine recombinante mutée pour augmenter son affinité aux FcRn, augmentant ainsi la demi-vie du tandem de 17 minutes à 30h. Les résultats d'étude *in vivo* réalisés dans des souris immunocompétentes montrent un retard de la croissance de tumeurs EGFR+ par un traitement par l'anticorps LiTCo seul, et une absence de croissance tumorale en combinaison avec un anticorps anti-PD-1. Ces effets antitumoraux ne sont pas associés à une immunotoxicité, contrairement au traitement par un anticorps agoniste de 4-1BB classique.

Les thérapies d'inhibition de points de contrôles agissent sur la fonction des cellules immunosuppressives une fois que le TIME est déjà établi. Toutefois, le compartiment myéloïde peut être aussi modulé par d'autres axes que les PCI qui agissent plus en amont en intervenant sur la prolifération des cellules à travers du blocage des facteurs de croissance comme le CSF (Colony Stimulating Factor), sur leur recrutement dans le TIME par des chimiokines ainsi que sur leur différenciation modulée par des cytokines, comme l'IL-10, M-CSF et TGFβ (Wang et al. 2022). L'association d'une de ces thérapies avec notre VHH anti-ILT4 pourrait permettre de restaurer plus efficacement les fonctions du compartiment myéloïde en ciblant plusieurs voies de signalisation. Associer le VHH anti-ILT4 à un anticorps bloquant un PCI exprimé par les lymphocytes pourrait permettre d'agir à la fois sur le compartiment myéloïde et sur le compartiment lymphoïde. Les résultats cliniques de phase I obtenus avec l'anticorps de MSD ont montré que la combinaison d'un anticorps anti-PD1 (pembrolizumab) en combinaison avec l'anticorps anti-ILT4 apporte une meilleure réponse que la monothérapie PD-1, suggérant un effet synergique de l'inhibition de ces deux points de contrôle immunitaires (Siu et al. 2022).

Bien que développer un anticorps qui ciblerait à la fois ILT4 et ILT2 ne soit pas la stratégie que nous avons décidé d'étudier, celle-ci pourrait cependant s'avérer intéressante. En effet, un anticorps reconnaissant à la fois l'ILT2 et l'ILT4 ciblerait en plus des cellules myéloïdes, les lymphocytes et les cellules NK. L'implication d'ILT2 dans l'échappement tumoral a été décrite (Carosella et al. 2015; Loumagne et al. 2014; Rouas-Freiss et al. 2017) (Loustau et al. 2020) par l'interaction avec les CMH I classiques et HLA-G associé à la β2m et ce récepteur a donc également été identifié comme un point de contrôle immunitaire pertinent dans le cancer. Bloquer les deux récepteurs pourrait en revanche engendrer des effets secondaires importants et le mode d'action d'un anticorps cross-réactif serait plus difficilement caractérisable.

Cependant une stratégie d'immunothérapie bloquant les deux récepteurs ILT2 et ILT4 est actuellement étudiée par un autre groupe, qui a présenté des résultats pré-cliniques au congrès de l'American Association for Cancer Research (AACR) en 2021 (Mondal et al. 2021). Cet anticorps reconnaît les deux récepteurs avec une forte affinité de l'ordre du nM et inhibe leur interaction avec les CMH-I, dont HLA-G. Il permet la reprogrammation de cellules myéloïdes suppressives et augmente leurs fonctions, comme la stimulation de réponses T allogéniques. Le blocage d'ILT2 améliore les fonctions cytotoxiques des NK et cellules T CD8 à l'encontre des cellules tumorales. Des résultats pré-cliniques en combinaison avec un anticorps anti-PD-1 ont conduit à l'initiation d'un essai clinique de cet anticorps anti-ILT2/ILT4 en combinaison avec l'anticorps pembrolizumab. Si cette approche de cibler les deux récepteurs s'avère pertinente et ne génère pas trop de toxicité de type auto-immune lors de la phase I de l'essai clinique, il pourrait être intéressant de reprendre le développement des VHH anti-ILT4 identifiés au cours de la thèse qui ont une réactivité croisée pour ILT2. Par exemple le VHH C9 ou D7, qui ont montré en ELISA (voir partie Résultats, Figure 25) une capacité à entrer en compétition avec l'ANGPTL2, bien que la concentration nécessaire soit importante (1 μ M). Cette approche est pertinente dans l'environnement compétitif des entreprises de biotechnologies, car elle permettrait d'optimiser les coûts et les délais par rapport à un nouveau projet de génération d'un nouveau VHH anti-ILT2 à partir de l'immunisation d'un alpaga puis criblage par phage-display et caractérisation.

La vascularisation anormale, caractéristique des tumeurs solides, permet aux cellules tumorales de maintenir leur approvisionnement en oxygène et nutriment (Nishida et al. 2006). Un des défis des premières thérapies anti-angiogénique réside dans l'équilibre à trouver entre une inhibition totale de la formation de nouveaux vaisseaux et la régulation de la formation de nouveaux vaisseaux anormaux dans la tumeur (W. S. Lee et al. 2020). En effet, bloquer totalement l'afflux sanguin dans la tumeur entraîne l'augmentation de l'hypoxie, la diminution de l'infiltration de cellules cytotoxiques et de la pénétration des traitements anticancéreux. Des études ont montré qu'une forte dose d'un anticorps anti-VEGFR2 aggrave l'hypoxie et limite l'infiltration de cellules CD8+, tandis qu'une dose plus faible du même anticorps permet de rétablir la formation de vaisseaux normaux, aboutissant à une meilleure infiltration par les lymphocytes T (Huang et al. 2012). Cette angiogenèse est orchestrée par plusieurs types cellulaires du TME, comme les fibroblastes et certaines cellules du système immunitaire. En

particulier, les macrophages de type M2 sécrètent des facteurs de croissance tels que VEGF (Colegio et al. 2014) (Lewis and Pollard 2006). Les DCs et MDSCs participent également à la mise en place de la néovasculature anormale de la tumeur (W. S. Lee et al. 2020). La stratégie de combinaison d'un anticorps ciblant un PCI du compartiment myéloïde avec un anticorps ciblant un facteur angiogénique comme VEGF permettrait donc d'augmenter par un effet synergique l'efficacité des thérapies antitumorales. Des études cliniques de combinaison thérapeutique, réalisées chez des patients atteints de cancers hépatiques ont donné des résultats encourageants. Bien que deux essais cliniques de phase III testant un anticorps anti PD-1 dans ce cancer aient échoué à prouver une meilleure efficacité que le traitement de référence, Sorafenib, (inhibiteur de kinases associées au récepteur au VEGF), un essai clinique associant atevolumab (anti PD-L1) et bevacizumab (anti VEGF-A) en 2019 a montré des taux de survie supérieurs au traitement de référence, sans progression de la maladie et tout en maintenant le nombre d'effets secondaire de grade 3-4 similaire, chez 57% et 55% des patients respectivement (Cheng et al. 2019).

Le VHH B8 pourrait également permettre de potentialiser d'autres types d'immunothérapies, telles que les CAR T. En effet, une des limitations majeures au succès de ces thérapies dans les tumeurs solides provient de l'inhibition par le microenvironnement immunosuppresseur des fonctions des cellules CAR T (Sternier and Sternier 2021) et l'un des axes d'améliorations consiste à associer une thérapie CAR T ciblant un TAA à un anticorps reprogrammant le TIME. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 (Grosser et al. 2019) permet de restaurer la fonctionnalité de cellules CAR T « épuisées » (Cherkassky et al. 2016). Dans cet optique, la reprogrammation des cellules myéloïdes du microenvironnement suppresseur par le VHH-B8, peut être une approche prometteuse pour optimiser les effets des thérapies CAR T.

Suite de l'étude préclinique de l'efficacité du VHH B8 en vue de commencer une étude clinique de phase I

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèses ont permis d'établir la preuve de concept (POC) *in vitro* de l'efficacité du VHH B8 à inhiber l'activation du récepteur ILT4 et son activité biologique sur les macrophages.

Des études chez la souris sont en cours chez Invectys afin d'établir la preuve de concept *in vivo*. L'efficacité de B8-IgG4 sur la croissance tumorale sera ensuite évaluée dans un modèle de souris immunodéficientes humanisées avec des cellules myéloïdes CD34+ porteuses de xénogreffes issues de patients atteints de carcinomes rénaux (RCC). Le profil de polarisation de macrophages M1/M2 sera également évalué. Pour valider l'utilisation de ce modèle, la bonne tolérance de B8-IgG4 a été validée dans une étude portant sur le suivi du poids de souris immunodéficientes ayant reçu l'anticorps en injection intraveineuse ou péritonéale.

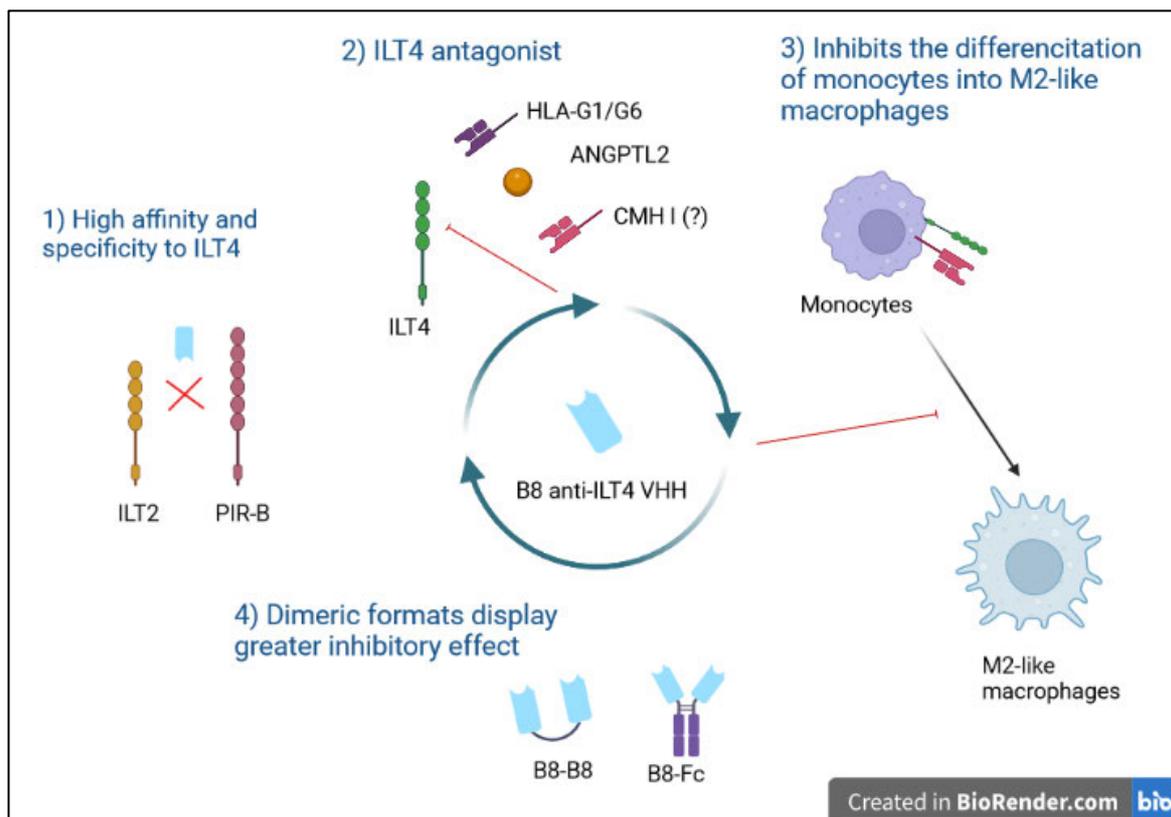


Figure 37 : Résumé des caractéristiques et du mode d'action du VHH B8 anti-ILT4 développé dans ces travaux de thèse

Conclusion

Le cancer est une pathologie multiple, tant par ses causes que par les types cellulaires et les mécanismes moléculaires impliqués dans son développement. L'avènement des technologies d'analyse à haut débit telles que la génomique, la transcriptomique et la protéomique ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de la médecine personnalisée. Contrairement aux traitements de chimiothérapie dont la cytotoxicité est peu ciblée, l'objectif est maintenant de fournir à chaque patient le traitement le plus adapté selon différents biomarqueurs pronostiques.

Les anticorps monoclonaux ont permis le développement de ces thérapies ciblées et notamment des immunothérapies bloquant des points de contrôle immunitaire (PCI), des mécanismes physiologiques détournés par les cellules tumorales leur permettant d'échapper au système immunitaire. Des thérapies utilisant des anticorps monoclonaux bloquant des PCI, tels que PD-1/PD-L1 et CTLA-4, sont disponibles depuis près d'une décennie. Malgré le succès de ces thérapies pour la survie des patients, notamment atteints de mélanomes, l'absence de l'expression de ces PCI ou la résistance acquise aux traitements limitent le nombre de patients qui peuvent en bénéficier. Il apparaît aujourd'hui clair que l'efficacité des thérapies bloquant des PCI repose sur la capacité à cibler un large spectre de ces molécules.

Notre étude s'inscrit dans ce contexte, et nous avons développé grâce à la technologie des VHH, de petits anticorps simple chaîne innovants issus des anticorps homodimériques des camélidés, un anticorps bloquant le récepteur ILT4. L'implication de ce récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes dans le développement tumoral a été établie et il est considéré comme un nouveau point de contrôle immunitaire.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse établissent le potentiel d'un VHH antagoniste d'ILT4, hautement spécifique et affin pour ce récepteur, capable d'inhiber *in vitro* la polarisation de monocytes vers un phénotype de macrophages pro-tumoraux.

L'entreprise Invectys a pour objectif de continuer le développement pré-clinique puis clinique de ce nano-anticorps anti-ILT4, afin qu'il fasse à l'avenir partie de l'arsenal des molécules immunomodulatrices disponibles en thérapies.

Résultats annexes

Résultat annexe 1. Mise en place de la méthode de production et purification de HLA-G6-mFc

HLA-G est une protéine complexe à produire. Plusieurs systèmes de production ont été mis en place par Invectys, pour obtenir la protéine HLA-G5 ou HLA-G6 solubles dans des systèmes de production eucaryotes. Ces systèmes permettent d'utiliser le surnageant récolté contenant HLA-G pour des tests ELISA ou cellulaires, mais le rendement de production est faible et n'a pour l'instant pas permis la purification de la protéine en quantité suffisantes pour réaliser les tests biochimiques nécessaires à mes travaux de tests. D'autres équipes ont réussi produire HLA-G en bonne quantité, notamment pour des études de cristallographie, en utilisant des systèmes de production procaryotes (Shiroishi, Kuroki, Ose, et al. 2006; Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al. 2006). Dans ces procédés de production, rHLA-G se trouve dans les corps d'inclusion, des agrégats de protéines mal repliées, qui se forment dans le cytoplasme des bactéries lorsque leur système de production de protéines est saturé (Singh et al, 2015). La récupération de la protéine d'intérêt requiert alors un processus compliqué d'isolation des corps d'inclusion, de leur solubilisation par ajout d'agents dénaturants puis de repliement et de purification de la protéine d'intérêt. Cette technique est coûteuse et l'étape de re-solubilisation puis repliement nécessite beaucoup de mise au point. N'étant pas une technique communément utilisée dans nos laboratoires, nous avons décidé de tenter une autre approche. Par conséquent nous avons décidé d'utiliser une expression en cellules eucaryotes en utilisant le vecteur pFuse et les cellules Expi293, car la production des VHH-Fc a donné de très bons rendements par ce système. De plus, comme décrit précédemment dans l'introduction, la protéine HLA-G dimérisée active plus efficacement ILT4 que le format monomérique, ce qui est un avantage pour la mise en place modèles cellulaires d'activation d'ILT4 par la suite. La production de HLA-G5 fusionnée à un Fc a été d'ailleurs rapportée précédemment (Favier et al. 2011) et est donc une approche pertinente.

Dans les systèmes de production eucaryotes, la production de protéines solubles est préférée aux productions intracellulaires, car le surnageant de culture contient beaucoup moins de protéines contaminantes que la fraction intracellulaire et permet en général d'obtenir une meilleure pureté après purification. Cependant les différentes méthodes de production de HLA-

G sous forme monomérique mises en place à Invectys ont montré que des systèmes de production eucaryotes, des cellules HEK ou CHO par exemple, permettent la production de la protéine mais que sa sécrétion dans le milieu de culture est très limitée.

Pour le développement de la méthode de production de HLA-G6-mFc, nous avons étudié les deux options. L'analyse en western blot des fractions de purification avec un anticorps spécifique de HLA-G (clone 4H84), nous montre que la protéine HLA-G6-mFc est bien produite par les cellules (Figure 38 A) mais que comme pour les méthodes de production précédentes la quantité sécrétée est très faible. La coloration au bleu de Coomassie nous permet d'estimer que la fraction d'élution obtenue à partir des cellules est composée aux 2/3 de HLA-G6-mFc mais contient également des protéines contaminantes (Figure 28 B). Par mesure de la densité optique à 280 nm nous avons estimé la concentration de HLA-G6-mFc dans cette fraction à 140 µg/mL. Bien que la fraction de purification à partir du surnageant ait un niveau de pureté supérieur, la quantité de HLA-G6-mFc est trop faible pour être utilisable dans les tests de fonctionnalité des VHH. Nous avons donc utilisé la protéine HLA-G6-mFc produite en intracellulaire (puits 7 sur les gels) pour les tests de compétition avec les VHH, en ELISA et sur cellules H1299-ILT4.

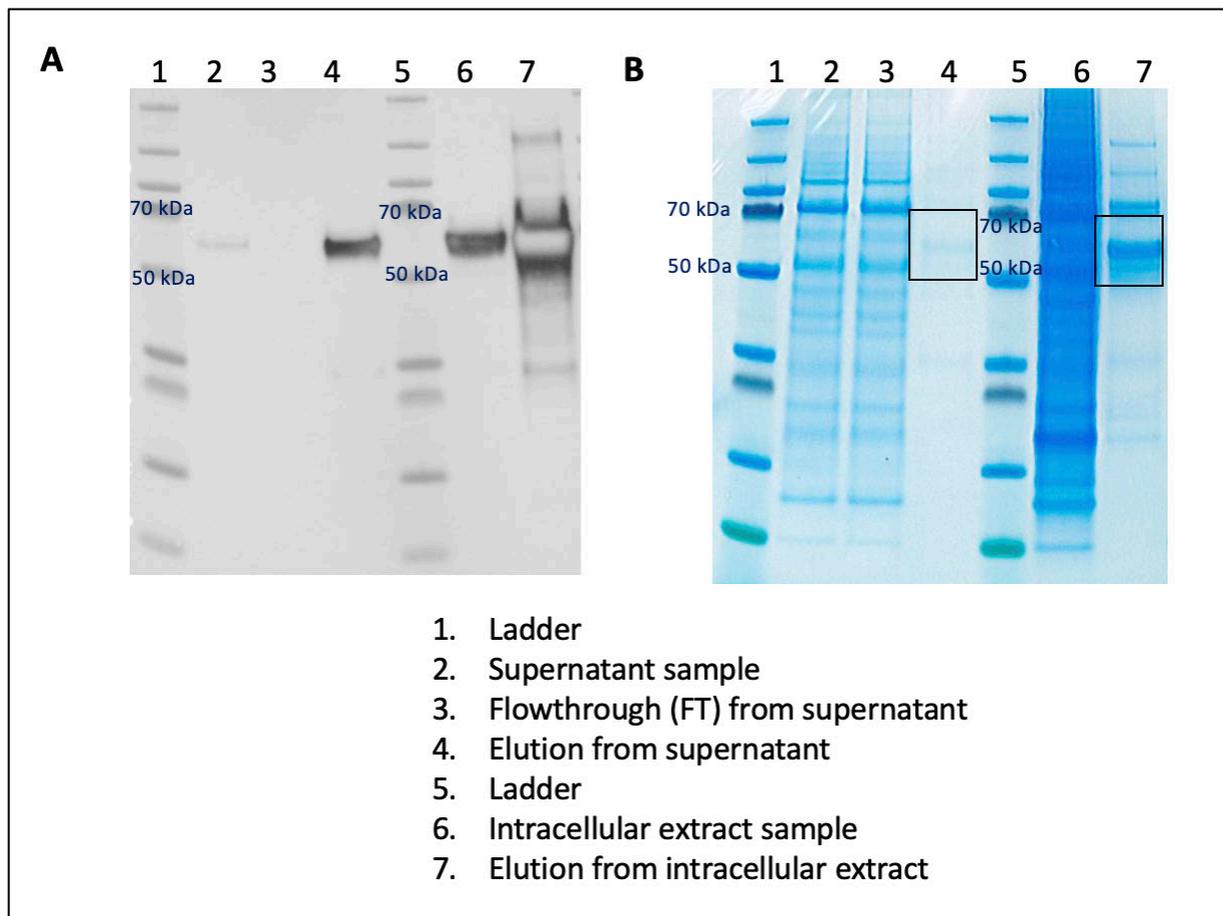


Figure 38. Purification de HLA-G6-mFc produit dans le système ExpiHEK293

A. Analyse en Western blot des fractions de purification. Le surnageant de culture et le contenu intracellulaire après lyse ont été purifiés par chromatographie d'affinité protéine G. Révélation avec un anticorps spécifique de HLA-G (clone 4H84-HRP).

B. Analyse en bleu de Coomassie des fractions de purification. Les bandes correspondant à HLA-G6-mFc sont encadrées sur le gel

Résultat annexe 2. Criblage de lignées tumorales exprimant ILT4 comme modèle d'étude *in vitro*

- 1) A549 et H1299, des lignées de carcinomes de poumon humain décrites comme exprimant ILT4

Afin d'étudier l'effet biologique de nos VHH, nous avons décidé d'utiliser une lignée de cellules tumorales exprimant ILT4. En effet cette approche nous a semblé simple à mettre en place, car plusieurs lignées tumorales commerciales ont été décrites dans la littérature comme exprimant ILT4 (Sun et al. 2008) (Liu et al. 2015) (Liu et al. 2019) (Zhang, Guo, et al. 2015; Zhang, Yu, et al. 2015) (Gao et al. 2021) (Chen et al. 2021).

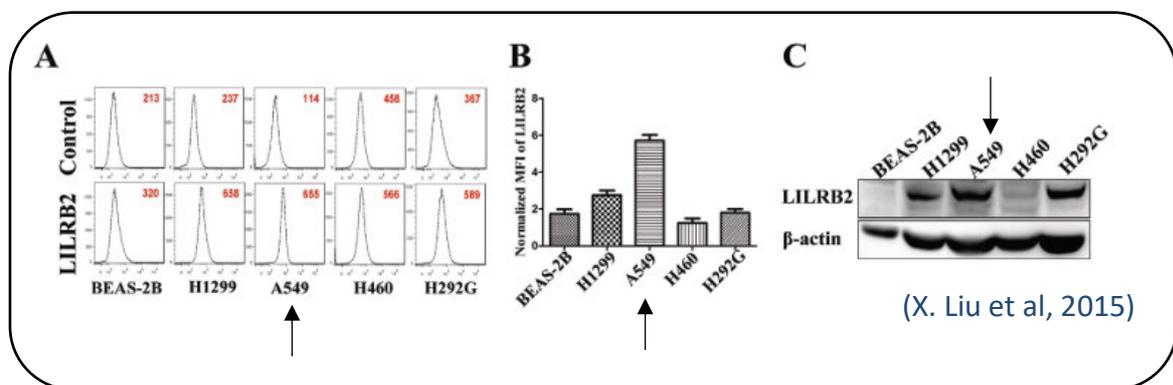


Figure 39 : Expression d'ILT4 par différentes lignées de cellules tumorales.

Analyse cytométrie en flux (A et B) et Western blot (C). (Figure adaptée de Liu et al. 2015)

Notre choix s'est porté sur les lignées A549 et H1299 de carcinome de poumon humain, car le niveau d'expression d'ILT4 analysé par cytométrie en flux (Figure 39 A et B) est le plus élevé en comparaison aux autres lignées criblées dans cette étude par X. Liu et al de 2015.

Les études que nous avons prévu de réaliser sur ces cellules consistaient à valider la compétition des VHH pour la fixation à l'ILT4 avec les deux ligands HLA-G et ANGPTL2 dans un premier temps. Puis nous souhaitons évaluer la conséquence de cette inhibition sur la prolifération cellulaire, en nous inspirant des études réalisées par X. Liu et al. (2015) et JF. Liu et al (2019) à l'aide d'ARN ILT4 interférant.

2) Analyse de l'expression d'ILT4 sur les cellules de carcinomes de poumons humains des lignées A549 et H1299

Avant de mettre en place les deux expériences citées ci-dessus, nous avons voulu valider l'expression d'ILT4 à la surface des cellules par cytométrie en flux.

Nous avons testé des cellules H1299 provenant de l'ATCC et des cellules A549 provenant de cinq sources différentes : l'ECACC (fournisseur européen de lignées cellulaires) l'ATCC, et quatre laboratoires de l'Institut Pasteur qui nous ont aimablement fourni leurs cellules. Les résultats de marquage avec l'anticorps de référence 42D1 sont présentés dans la Figure 39, A. Ces résultats sont représentatifs des différents marquages réalisés par la suite avec d'autres anticorps anti-ILT4 (clone 287219 de R&D Systems et clone 27D6 de Invitrogen). Nous avons été surpris de constater que les cellules A549 et H1299 n'exprimaient pas l'ILT4 et avons émis plusieurs hypothèses pour l'expliquer :

- Le décollement des cellules par la digestion enzymatique à la trypsine entraînait peut-être une digestion excessive de toutes les protéines de surface dont l'ILT4, et nous avons donc testé le décollement de ces cellules par une solution d'EDTA 0.5%. Cependant cette approche n'a pas été concluante, car les cellules A549 sont très adhérentes et il a fallu les décoller physiquement par aspiration-refoulement ce qui a engendré beaucoup de mort cellulaire.
- L'anticorps 42D1 ne permet pas de visualiser l'ILT4 : nous avons testé deux autres références d'anticorps utilisés dans des études (Gao et al. 2021) en cytométrie en flux, le clone 287219 (R&D Systems) et le clone 27D6 (Invitrogen).

Nous avons également contacté le Dr. Zheng Junke, auteur de la publication de X. Liu et al. afin de valider auprès de lui le protocole utilisé dans leur étude. Nous avons constaté que nous utilisons le même anticorps de détection 42D1-Pe et qu'ils utilisent également de la trypsine pour décoller les cellules. Les résultats négatifs obtenus sur nos lignées ne semblent donc pas être dus à notre protocole de cytométrie en flux.

Au vu de ces résultats négatifs, il nous a fallu développer une autre approche et nous avons décidé de générer à partir de ces deux lignées, des cellules exprimant ILT4 par transduction avec l'ADN génomique d'ILT4. Nous avons validé l'expression du récepteur à la surface des

cellules H1299-ILT4 transduites par cytométrie en flux (Figure 40 A), et nous avons également réalisé une analyse par Western blot d'extrait protéiques des lignées A549 et H1299 sauvages ou transduites (Figure 40, B).

Deux contrôles expérimentaux nous permettent d'analyser les résultats avec confiance. Premièrement, la protéine ILT4-ECD (produite par mes soins, voir partie Résultats « Mise en place de la méthode de production de l'ILT4-ECD ») a été déposée sur le même gel et la révélation avec l'anticorps anti ILTs (mAb D6, Santa Cruz) a bien fonctionné puisqu'on observe une bande nette à 70 kDa, poids moléculaire attendu pour l'ILT4-ECD (Figure 40, B).

Ensuite, la présence de la protéine β -actine dans les échantillons cellulaires nous permet de confirmer que la quantité de protéines déposée dans chaque puits est similaire et que l'extraction des protéines a bien fonctionné (Figure 40, B). On observe dans les cellules transduites uniquement, plusieurs bandes entre 70 kDa et 80 kDa environ (Figure 40, B). Ici on a analysé le contenu intracellulaire, donc on s'attend à avoir la protéine ILT4 à différents états de maturation. Le poids moléculaire d'ILT4 estimé à partir de séquence protéique est de 65 kDa, et la protéine mature après glycosylation a un poids moléculaire plus élevé à environ 85 kDa. On peut donc en conclure que seules les cellules transduites expriment l'ILT4.

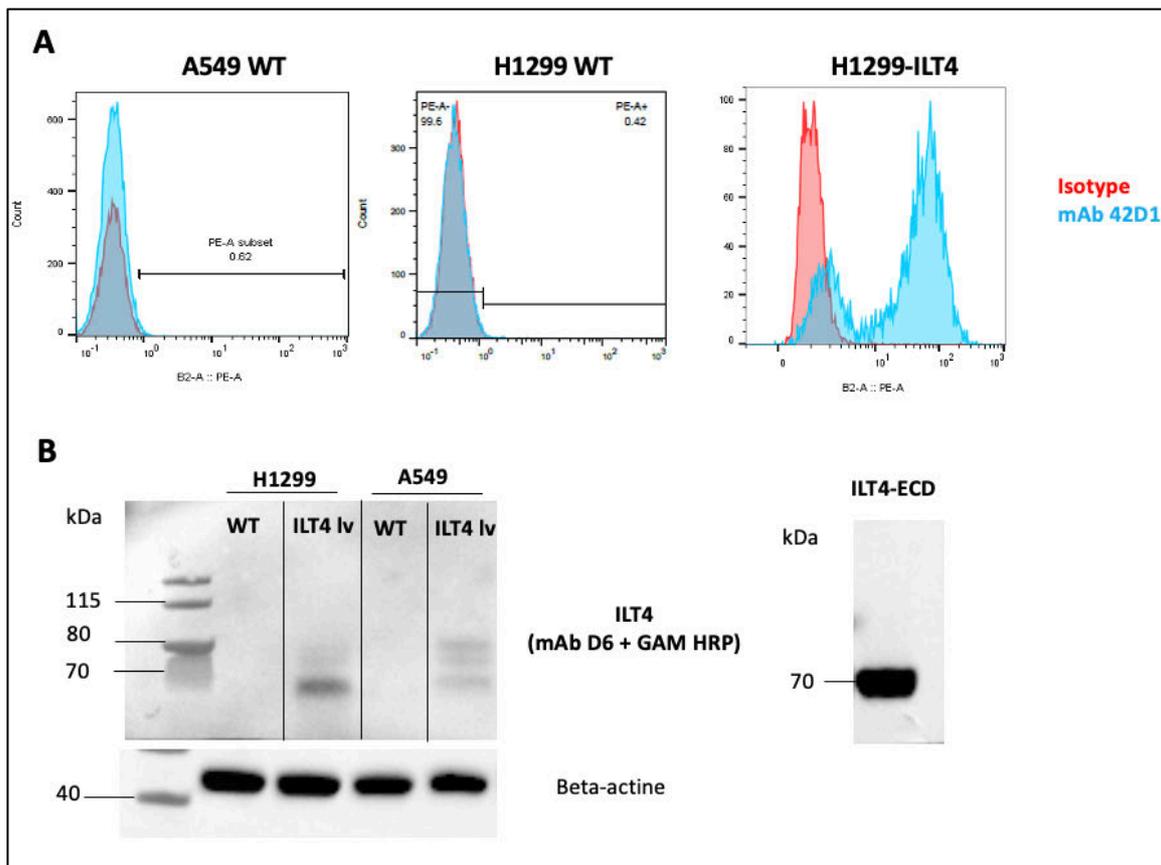


Figure 40 : Analyse des lignées cellulaires A549 et H1299 pour l'expression d'ILT4

A. Analyse de l'expression d'ILT4 à la surface des A549 et H1299. Cytométrie en flux. En rouge le marquage de l'isotype contrôle, en bleu le marquage par l'anticorps anti-ILT4 (42D1-Pe, Invitrogen).
B. Analyse de l'expression d'ILT4 dans les lignées A549 et H1299 WT ou transduites avec ILT4. Gel SDS PAGE en conditions dénaturantes et réductrices. En Western blot détection avec l'anticorps D6 (pan ILTs) et l'anticorps anti-souris HRP.

L'expression d'ILT4 dans de nombreuses lignées de cellules de carcinome de poumon humains a été rapportée. Ces lignées sont utilisées dans de nombreux modèles d'étude du rôle d'ILT4 dans le développement tumoral.

Les équipes utilisent différentes méthodes de détection d'ILT4 pour évaluer l'expression protéique d'ILT4. La présence d'ARNm par RT-PCR dans les cellules H1299 et A549 a été étudiée (Zhang et al, 2015, JN Liu et al, 2019, Chen et al, 2021). Cependant la transcription d'ARNm n'aboutit pas toujours à l'expression protéique.

Des équipes ont donc réalisé également des analyses par Western blot (Chen et al. 2021) Chen Gao et al 2021, Zhang et al 2015, JN Liu et al) sur des extraits cellulaires totaux, dans lesquels ils ont détecté la présence de la protéine. Sun et al, (2008) et Gao et al, (2021) ont validé l'expression d'ILT4 à la surface des cellules A549 par cytométrie en flux.

Nous avons donc tenté d'identifier la provenance de ces différences entre les résultats obtenus dans notre laboratoire et les résultats publiés. Tout d'abord, nous avons testé deux anticorps anti-ILT4 pour détecter la protéine en Western blot, utilisés par les équipes citées précédemment, les clones 1D4 (Abnova) et mAb 287219 (R&D System, MAB2078). Nous observons le même marquage sur les extraits cellulaires de cellules A549 WT ou de cellules témoins transduites avec ILT4 : plusieurs bandes de tailles différentes, entre 40 et 90 kDa, de forte intensité, suggérant une reconnaissance aspécifique de protéines cellulaires par cet anticorps (données non montrées). De plus, l'anticorps 1D4 ne reconnaît pas en Western blot notre contrôle positif expérimental, la protéine ILT4-hFc. L'anticorps 287219 reconnaît lui ILT4-hFc en Western blot, mais reconnaît sur les extraits de cellules A549 WT ou de cellules ILT4+ la même protéine de 40 kDa, qui ne correspond pas au poids moléculaire attendu de l'ILT4 endogène (entre 70 kDa et 90 kDa).

Enfin, avec le clone D6 (pan-ILTs), qui reconnaît ILT4-ECD en western blot (Figure 40, B) nous observons l'expression d'ILT4 dans les cellules A549 et H1299 transduites avec une construction ILT4, mais aucune expression dans les cellules WT.

Nous n'avons pas analysé la présence d'ARNm ILT4 par PCR, car le modèle cellulaire que nous voulions mettre au point pour tester l'antagonisme de notre VHH sur ILT4 nécessite la présence de la protéine exprimée à la surface.

Enfin, dans une étude en 2018 (Chen et al. 2018), sur la reprogrammation de macrophages M2 en M1 par l'antagonisme d'ILT4, les auteurs utilisent la lignée de cellules A549, comme cellule tumorale capable de générer *in vitro* des TAMs, à partir de monocytes humains isolés de PBMCs. Ce protocole de génération de TAMs a été décrit antérieurement, notamment par Muller-Quernheim et al en 2012 (Müller-Quernheim et al. 2012). Des monocytes cultivés en co-culture ou en présence de milieu conditionné de culture des cellules A549 se différencient en phénotype de macrophages M2, suggérant que ces cellules tumorales sécrètent des facteurs induisant cette différenciation.

Dans l'étude de H. Chen et al, le traitement de ces macrophages alternativement différenciés *in vitro* avec un anticorps anti-ILT4 les reprogramme vers un phénotype M1-like, avec la diminution de l'expression de CD14 CD163. Ensuite, ils ont étudié l'impact d'un traitement anti-ILT4 seul ou en combinaison avec un anti-PD-1 sur la croissance tumorale dans un modèle de souris NSG porteuses de tumeur A549. Les deux traitements permettent un ralentissement de la croissance tumorale, avec une meilleure efficacité pour le traitement en combinaison, et le

profil des macrophages infiltrés vont dans le même sens que les résultats obtenus *in vitro*. Les auteurs ne mentionnent pas l'analyse de l'expression d'ILT4 à la surface de ces cellules A549, bien que les études présentées précédemment décrivant cette expression soient antérieures à la leur. On peut se demander si les A549 dans leur étude expriment ILT4 et si la diminution de la prolifération provient d'un ciblage direct de ces cellules par l'anticorps anti-ILT4.

Il est intéressant de noter que la majorité des études rapportant l'expression d'ILT4 sur les lignées tumorales A549 ou H1299 (Sun et al 2008, P. Zhang et al 2015 x2, JN. Liu et al, 2019, Gao et al 2021, Chen et al 2021) ont été réalisées par les mêmes équipes, les auteurs Sun et Gao étant signataires de toutes ces publications. Seule l'étude de Liu et al, 2015 a été réalisée dans un laboratoire sans lien à priori avec celui de Sun et Gao. L'étude utilisant les cellules A549 sans montrer l'expression d'ILT4 à leur surface a également été réalisée par une autre équipe. Les résultats obtenus dans les études de Sun et Gao pourraient être dus à un protocole expérimental particulier ou à la dérive génétique des lignées au cours des cultures cellulaires. Le constat de l'incohérence entre les résultats de notre étude et de celles précédemment réalisées sur les lignées A549 et H1299, nous amène à questionner la variabilité expérimentale entre les pratiques dans différents laboratoires, et donc la répétabilité de certains protocoles expérimentaux.

Résultat annexe 3. B8 reconnaît un épitope natif et le profil de glycosylation d'ILT4-ECD ne semble pas interférer avec sa fixation à la protéine.

Deux types d'ajout lors des modifications post-traductionnelles de motifs de sucre existent : la glycosylation-N qui consiste à ajouter des polysaccharides sur un résidu Asparagine ou la glycosylation-O sur une sérine ou une thréonine. Les enzymes présentes dans le kit (Protein Deglycosylation Mix II, NEB) permettent d'éliminer toutes les glycosylations des résidus Asparagine et certaines des résidus Sérine et thréonine. Selon le degré de complexité de glycosylation des protéines, la déglycosylation peut ne pas être complète. De plus la déglycosylation fonctionne mieux sur une protéine dénaturée, condition obtenue avec le tampon I du kit, que sur la protéine native, condition obtenue avec le tampon II. La différence de poids moléculaire entre l'ILT4-ECD déglycosylé avec le tampon I ou II confirme que la déglycosylation a été moins efficace avec le tampon II (Figure 41). En revanche il ne reconnaît pas la forme d'ILT4-ECD déglycosylée en conditions dénaturantes. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que B8 reconnaît un épitope natif et non linéaire, comme validé par les résultats de Western blot sur l'ILT4-hFc réalisé en conditions dénaturantes (données non montrées), soit parce que la déglycosylation de l'ILT4 sous forme dénaturante a retiré plus de motifs de glycosylation dont celui reconnu potentiellement par B8.

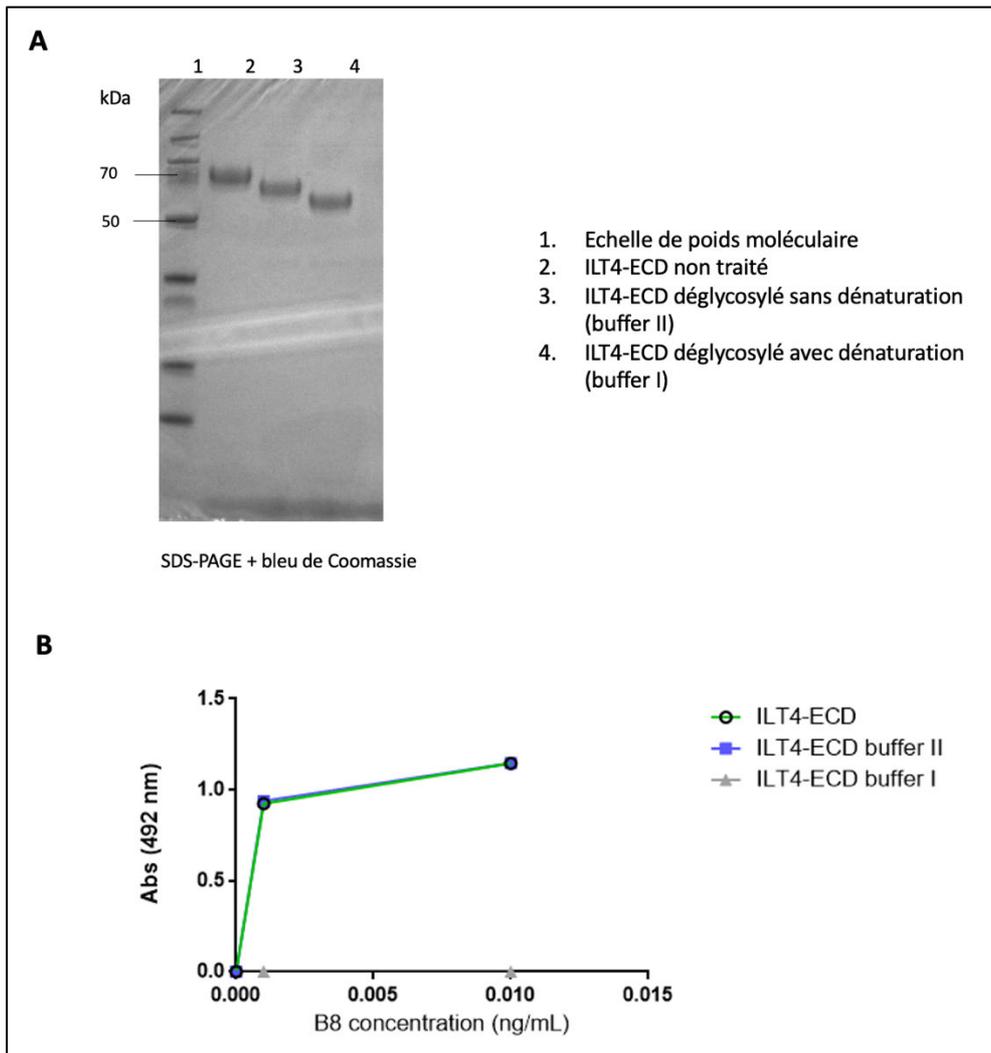


Figure 41 : Étude de l'impact de la déglycosylation et dénaturation d'ILT4-ECD sur l'affinité de B8

A. Analyse de l'efficacité de la déglycosylation d'ILT4 ECD. Comparaison du profil de migration par SDS-PAGE d'ILT4 ECD non déglycosylé, ILT4 déglycosylé dans un buffer non dénaturant (buffer II) ou dénaturant (buffer I).

B. Analyse de la capacité de B8 à reconnaître les formes déglycosylées de l'ILT4. (ELISA) en vert ILT4-ECD non traité, en bleu l'ILT4 déglycosylé non dénaturé et en gris l'ILT4 glycosylé dénaturé.

Résultat annexe 4. Expression des CMH de classe I par les macrophages M2-like

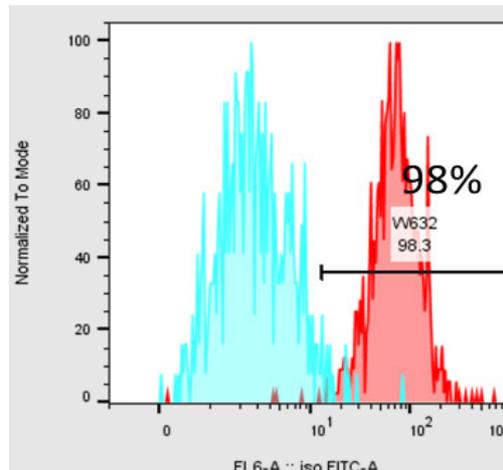


Figure 42 : Analyse de l'expression des CMH-I sur les macrophages M2-like contrôles à jour 7 du protocole de différenciation.

Cytométrie en flux. En bleu, l'isotype contrôle, en rouge l'anticorps pan-CMH de classe I (clone W6/32, Biolegend).

Nous avons analysé l'expression des molécules CMH de classe I par les macrophages de phénotype M2. En effet, dans le modèle d'étude de l'inhibition de la différenciation en macrophages M2 par le VHH B8, nous n'avons pas incubé les cellules avec un des ligands solubles d'ILT4, HLA-G6-mFc ou l'ANGPTL2. La signalisation via le récepteur ILT4 est donc activée dans ces cellules par l'interaction avec un autre ligand. Nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir des CMH-I, et nous avons en effet observé leur présence à la surface des macrophages M2.

Résultat annexe 5. Quel modèle murin pour l'étude *in vivo* de l'efficacité du VHH-B8 ? Développement d'un modèle de souris transgénique PIR-B-/ILT4+ par recombinaison homologue

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec la Dr. Francina Langa-Vives, responsable du Centre d'Ingénierie Génétique des Souris de l'Institut Pasteur et le Dr. Harald Kranz de la société allemande GEN-H spécialisée en biologie moléculaire.

1) Le rationnel du modèle proposé

Un modèle de souris transgéniques ILT4+ a été généré par l'équipe de Horuzsko en 2005 (Ristich et al. 2005) (Ristich et al. 2007). Dans ce modèle, l'expression d'ILT4 est sous le contrôle des éléments de régulation de l'expression de CD11c chez la souris, restreignant ainsi la présence du récepteur humain à la surface des cellules myéloïdes. Cependant l'auteur nous a informés que la lignée ILT4+ a été perdue à la suite de soucis techniques de conservation des embryons et n'est donc plus disponible.

Des expériences de greffe de peau allogénique avaient été réalisées chez ces souris, en présence ou non de HLA-G, afin d'étudier l'impact de l'interaction entre HLA-G et l'ILT4 sur la tolérance envers le greffon. Le rejet de greffe chez les souris ILT4+ est fortement ralenti par l'injection de HLA-G. En effet chez ces souris, 75% des greffes sont toujours présentes plus de 40 jours après la transplantation, tandis que tous les greffons ont été rejetés chez les souris ILT4+ non traitées 12 jours après transplantation. Le phénotypage des cellules dendritiques des souris ILT4+ traitées avec HLA-G indique l'induction d'un phénotype tolérogène dans cette population cellulaire.

Mais il est intéressant de noter que HLA-G ralenti également le rejet de greffe dans les souris WT traitées avec HLA-G. En effet, chez ces souris traitées, il faut 15 jours pour que toutes les greffes aient été rejetées contre 9 jours pour les souris WT non traitées.

Les auteurs avancent l'hypothèse que cette tolérance du greffon chez les souris WT est induite par l'activation du récepteur PIR-B par HLA-G. En effet, les auteurs ont montré précédemment que HLA-G est un ligand de PIR-B et que HLA-G induit l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques de souris (Liang et al. 2002).

On peut donc imaginer que la présence de PIR-B dans un modèle murin visant à étudier l'efficacité de l'inhibition d'ILT4 par le VHH B8 puisse induire un biais dans l'analyse des résultats. Les résultats précédemment présentés dans la partie « Etude de la réactivité croisée des VHH » ont montré que le VHH B8 ne reconnaît pas le récepteur PIR-B. Il ne sera donc pas capable d'inhiber son activation par HLA-G *in vivo*.

Nous avons donc décidé de générer une lignée de souris transgéniques exprimant ILT4 sur les cellules myéloïdes, en lieu de PIR-B. Une stratégie de « knock-out par knock-in » a été mise au point, consistant à remplacer la partie du gène codant pour le récepteur PIR-B par l'ADN codant pour ILT4, afin de conserver les éléments de régulation de l'expression du récepteur murin.

Il existe principalement trois stratégies pour la génération de souris transgéniques : l'introduction du gène par vecteur rétroviral, l'insertion par CRISPR-Cas9 ou « l'intégration du transgène par gène ciblé ». C'est cette troisième approche qui est utilisée au centre d'ingénierie génétique des souris (Figure 43 C). Elle consiste à modifier le génome de cellules souches embryonnaires (ES) de souris *in vitro* avec le transgène d'intérêt, sélectionner les cellules ES correctement modifiées et les injecter dans le blastocyste de souris. L'intégration d'un transgène par recombinaison homologe est un événement rare, et lorsqu'il a lieu un seul chromosome est modifié. La différence de couleur du pelage des cellules ES et des blastocystes permet de sélectionner les descendants hétérozygotes, puis les homozygotes sont obtenus par croisements successifs sur plusieurs générations avec le fond génétique désiré (Tratar et al. 2018).

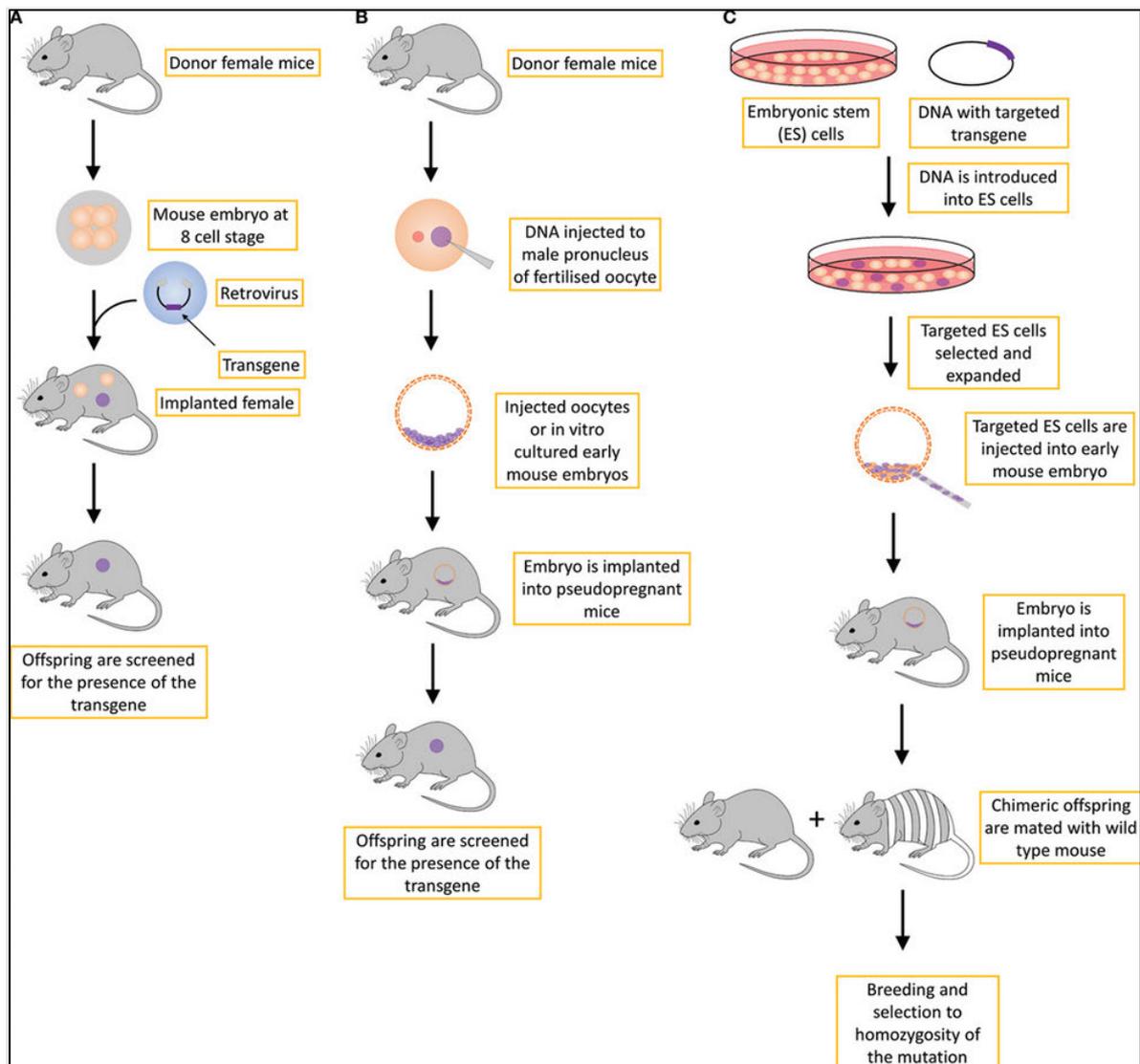


Figure 43 : schéma du procédé de génération de souris transgéniques par insertion de transgène

2) Conception du transgène et de la stratégie d'insertion par recombinaison homologue

Le transgène a été designé par le Dr. Harald Kranz, à partir des séquences des gènes ILT4 et PIR-B de la base de données « e!Ensembl », références ENST000000314446.10 et ENSMUSG00000058818.14. Pour insérer le gène codant pour le récepteur ILT4 au locus de PIR-B, la stratégie de recombinaison homologue a été choisie. Celle-ci s'appuie sur les mécanismes endogènes de réparation de l'ADN génomique, à la suite de l'appariement de séquences homologues flanquant le gène cible. La longueur minimale recommandée pour ces séquences, appelées bras d'homologie, est de 2 kb. Au vu de la grande taille du transgène ILT4 à insérer, il

a été décidé de dessiner des bras d'homologies de 5 kb. Ces séquences correspondent aux régions du chromosome 7 de la souris en région 3' et 5' du gène PIR-B. Le gène de résistance à la néomycine a été ajouté en phase avec l'expression de l'ILT4 pour permettre la sélection des cellules modifiées. La structure du transgène est illustrée dans la figure 44.

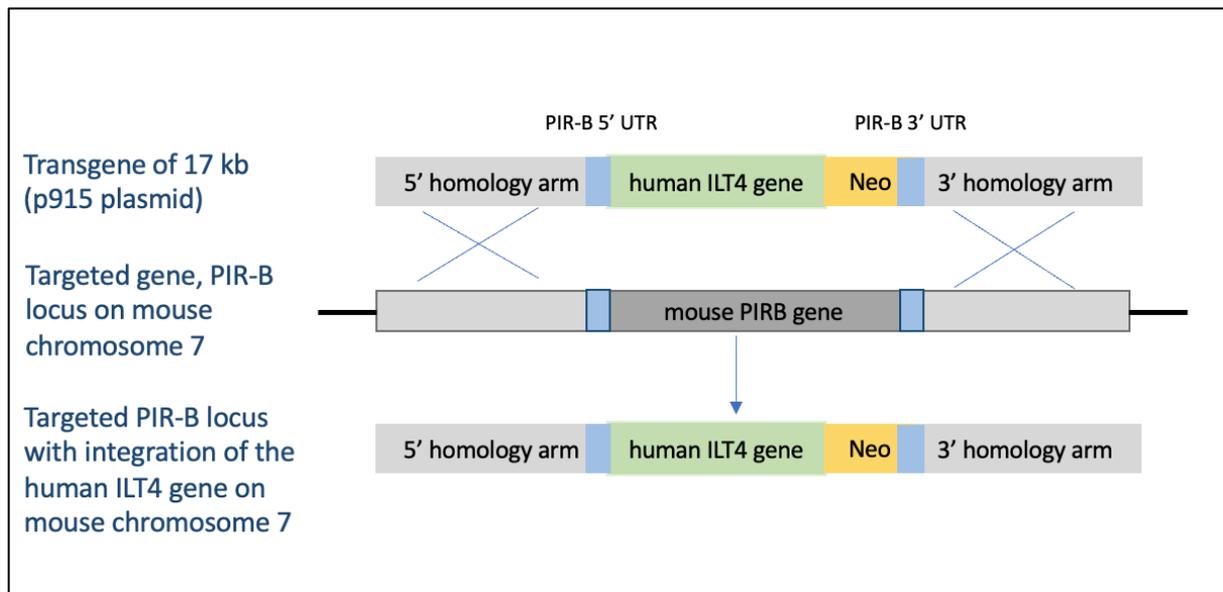


Figure 44 : Présentation de la stratégie d'intégration ciblée du transgène par recombinaison homologue.

L'étape de micro-injection des cellules ES dans le blastocyste de souris embryonnaires peut échouer. Il est donc recommandé d'obtenir 4 à 6 clones pour cette étape. La probabilité de réussite de l'intégration ciblée lors de la transfection des cellules ES est de l'ordre de 1% à 3%, donc pour obtenir 3 à 6 clones il faut en cribler environ 300.

3) Validation du protocole de PCR « long range »

Les premières étapes du projet ont été réalisées par la plateforme d'ingénierie des souris. Des cellules ES de souris male de fond génétique C57BL/6J ont été transfectées avec la construction contenant ILT4 (plasmide p915), et les clones résistants ont été sélectionnés puis amplifiés dans un milieu de culture contenant de la néomycine. Les 288 clones de cellules ES en plaques de culture de 24 puits ont été lysés et congelés.

Les critères de sélection des cellules ES transfectées sont : l'insertion du transgène doit avoir eu lieu de façon spécifique au niveau du locus de PIRB, et une seule intégration doit avoir eu

lieu par cellule. Ceci permet d'obtenir une souris transgénique dont l'expression d'ILT4 est restreinte au territoire d'expression de PIRB et dont le génome n'a pas été modifié par une autre intégration non voulue.

Les méthodes expérimentales pour valider cette intégration sont normalement la PCR, pour valider l'intégration spécifique, puis un Southern blot sur les clones positifs pour valider l'intégration unique. Cependant, nous n'avons pas l'expertise au laboratoire pour mettre en place la technique de Southern blot, et nous n'avons pu identifier aucun laboratoire à l'Institut Pasteur qui utilise toujours cette méthode. Nous avons décidé que l'insertion unique serait vérifiée par séquençage sur les clones positifs à l'issue du premier criblage par PCR.

Le criblage par PCR a pour objectif de valider que l'insertion du transgène a eu lieu spécifiquement au locus voulu. L'insertion spécifique du transgène au locus de PIR-B crée une nouvelle séquence d'ADN à la jonction entre le chromosome 7 et le transgène, et la PCR permet d'amplifier spécifiquement cette nouvelle séquence. Ainsi une PCR utilisant une amorce sens s'appariant sur le chromosome 7 en amont du site d'insertion 5' et une amorce antisens s'appariant dans le transgène au début du gène ILT4, permettra l'amplification spécifique de cette néo-séquence. Et de la même manière pour la région 3'. Par la suite, nous ferons référence à ces séquences d'ADN nouvellement créées par l'insertion spécifique du transgène par le terme « région charnière » en 5' ou 3'.

Pour « designer » les amorces, nous avons réalisé une carte génétique *in silico* qui correspond à la séquence d'ADN sur le chromosome 7 avec le gène ILT4 inséré après le promoteur de PIR-B.

Pour le premier criblage, nous avons dans un premier temps voulu valider que le protocole de PCR était efficace pour l'amplification de longs fragments d'ADN (Figure 45 A). Les régions charnières en 5' et 3' sont en effet de grands fragments d'ADN d'environ 6 à 7 kb, et les techniques d'amplification par PCR de tels fragments, de surcroît sur de l'ADN génomique, ne sont pas toujours faciles à mettre en œuvre.

Un échantillon représentatif des résultats obtenu à la suite des PCR réalisées sur les 288 clones est présenté dans la figure 44.

La difficulté de ce premier criblage a été l'absence de contrôle positif expérimental, pour nous assurer de la fiabilité des résultats obtenus. En effet, en l'absence d'un contrôle positif, il est

possible de conclure plusieurs cas de figure à partir du résultat de la PCR 1 (Figure 45 B). En effet à l'issue de cette PCR, on observe que l'intégralité du gène ILT4 a été amplifié à partir du plasmide p915 utilisé pour la transfection, mais aucune bande n'est observée pour les PCR réalisées sur l'ADN des cellules ES transfectées. On pourrait alors conclure à l'absence d'intégration du gène ILT4 dans ces cellules. Pourtant, ces cellules ont été transfectées avec le plasmide p915 et ont été sélectionnées pour leur capacité à croître en présence de néomycine. Et le résultat des PCR 2 et 3, qui permettent l'amplification de l'exon 5 d'ILT4 et de la néomycine, confirment bien que le transgène a été intégré dans les cellules ES. On doit donc en conclure que l'absence d'amplification d'ILT4 sur les cellules ES avec les conditions de la PCR 3 est dû à un souci expérimental et non à l'absence du gène ILT4.

Ce résultat nous a indiqué que la PCR « long range » requiert plus de mise au point, que nous présenterons dans la partie suivante.

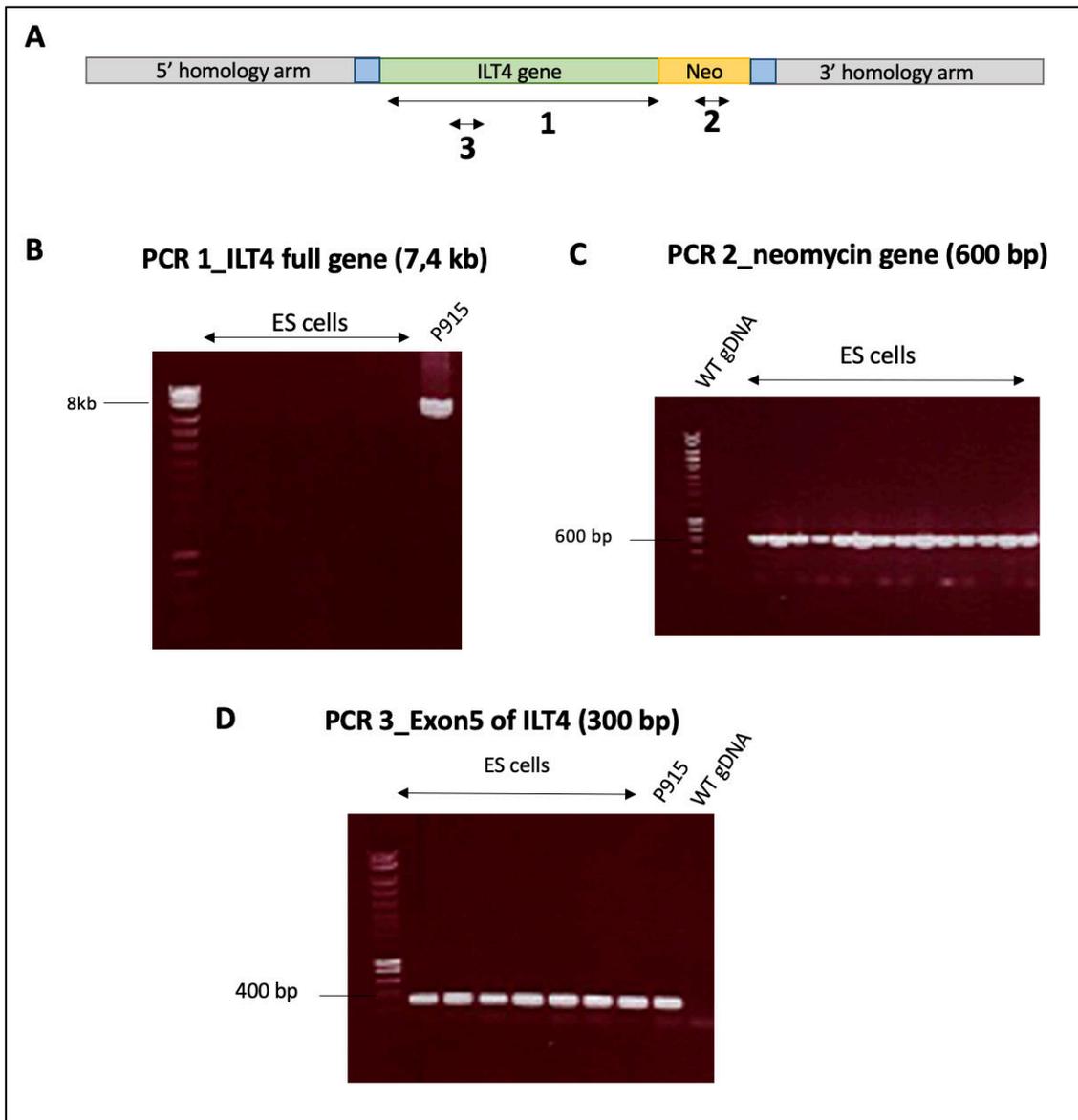


Figure 45 : (1) Criblage des cellules souches embryonnaires pour la génération d'une lignée de souris ILT4+ PIRB-

- A. Stratégie de validation de l'insertion du transgène par amplification de la néomycine et exon ILT4
- B. PCR 1 amplification du gène ILT4 entier
- C. PCR 2 amplification d'une séquence du gène de résistance à la néomycine
- D. PCR 3 amplification de l'exon 5 d'ILT4

- 4) Criblage 2_ amplification de la région charnière 5': PCR long range avec un contrôle positif, validation des couples d'amorce et validation de l'insertion d'ILT4 dans les cellules ES transfectées

Nous avons rencontré des difficultés dans la mise en place de la PCR pour valider l'insertion ciblée du transgène, et nous avons donc réalisé plusieurs optimisations pour continuer le criblage des cellules ES. Tout d'abord, la nécessité d'introduire un contrôle positif expérimental est apparue à la suite des résultats montrés précédemment, et le Dr. Harald Kranz a généré un chromosome bactérien artificiel (BAC) contenant la séquence ADN du transgène inséré sur le locus de PIR-B. De cette façon, nous avons pu mettre au point les conditions de PCR permettant l'amplification des régions charnières sur la construction BAC, avant de faire le criblage sur les clones ES. D'autre part à la suite des résultats obtenus lors du criblage 1 présentés précédemment, nous avons changé d'enzyme Taq pour la PCR et utilisé l'enzyme LA Taq (TaKaRa) spécialement conçue pour l'amplification de grands fragments d'ADN.

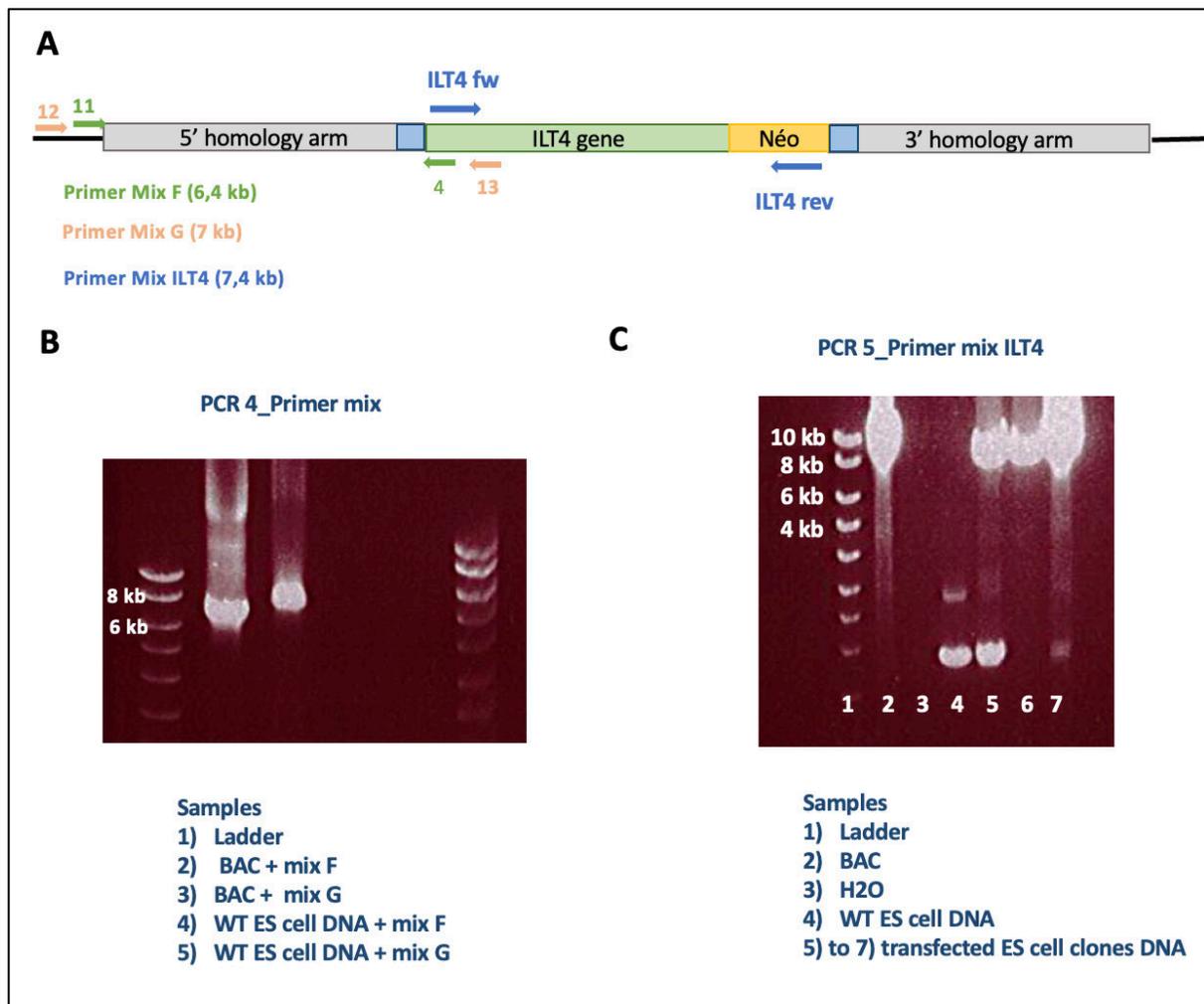


Figure 46 : (2) Criblage des cellules souches embryonnaires pour la génération d'une lignée de souris ILT4+ PIRB-

- A. Illustration de la stratégie de criblage 2.** Trois couples d'amorces sont utilisés. Les couples F (en vert) et G (en orange) pour l'amplification de la région charnière 5', et le couple ILT4 (en bleu) pour l'amplification du gène ILT4.
- B. Criblage 2 avec la construction BAC contrôle**

Les amorces utilisées pour réaliser les PCR ont été créés pour amplifier les régions charnières entre le chromosome murin et l'insert ILT4, comme illustré sur la figure 46 A. Deux couples d'amorces, F et G, ont été utilisés pour l'amplification de la région charnière 5'. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'amplification de cette région. Cette amplification fonctionne sur le BAC, car on observe avec les deux mélanges réactionnels l'amplification de fragments à la taille attendue, à environ 6,4 kb et 7 kb. L'absence d'amplification dans les mêmes conditions sur l'ADN des cellules ES WT nous confirme que les amorces sont bien spécifiques de la séquence d'intérêt et n'amplifient rien d'autre sur le génome murin. Une fois

ces deux contrôles réalisés, nous avons effectué le criblage par PCR sur les 288 clones transfectés. Et cette fois-ci encore, nous n'avons observé aucune amplification (Figure 46 B). L'un des derniers paramètres qui pourraient influencer la PCR est la qualité de l'ADN génomique des cellules ES transfectées. En effet, l'ADN peut être endommagé et fractionné lors de l'extraction à partir du lysat cellulaire, ce qui empêcherait l'amplification de longs fragments.

Le dernier contrôle que nous avons donc effectué consiste à amplifier la séquence entière de l'ILT4 inséré à partir de l'ADN des cellules ES. La séquence mesure 7,4 kb et devrait être présente dans tous les clones ES transfectés.

Les résultats de la PCR 5 sont présentés sur la figure 46 C. On observe qu'un fragment de haut poids moléculaire est amplifié sur le BAC et sur l'ADN des cellules ES testées, correspondant au gène ILT4. En effet la PCR à partir de l'ADN WT n'amplifie pas de fragments de haut poids moléculaire. Seule une petite bande aspécifique d'environ 400 pb est amplifiée sur l'ADN WT et sur l'ADN de plusieurs cellules ES transfectées.

Cette dernière PCR nous permet de conclure que nos conditions de PCR sont optimales pour l'amplification de longs fragments d'ADN, que les amorces utilisées pour le criblage de l'insertion en 5' (mix F et G) sont bien spécifiques de cette région, et enfin que la qualité de l'ADN génomique extrait des cellules ES transfectées permet l'amplification de longs fragments. A ce stade, l'hypothèse qui nous semble la plus probable est que si aucune PCR ne permet l'amplification de la région 5', c'est qu'aucune insertion ciblée n'a eu lieu dans les cellules ES transfectées. Plusieurs options sont envisagées afin de continuer le projet de génération de ces cellules ES et le transgène. Il serait possible d'ajouter un guide CRISPR lors de la transfection avec le plasmide p915, qui permettrait de faciliter l'insertion ciblée du gène.

Résultat annexe 6. Mesure d'affinité de l'interaction entre les VHH et ILT4 par Interférométrie bio couche

Les mesures d'affinité ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire, par le Dr. Gabriel Aymé qui a généré et criblé la banque des VHH anti-ILT4.

Les courbes d'association et de dissociation des 6 VHH sélectionnés pour mon projet de thèse sont présentées ci-dessous.

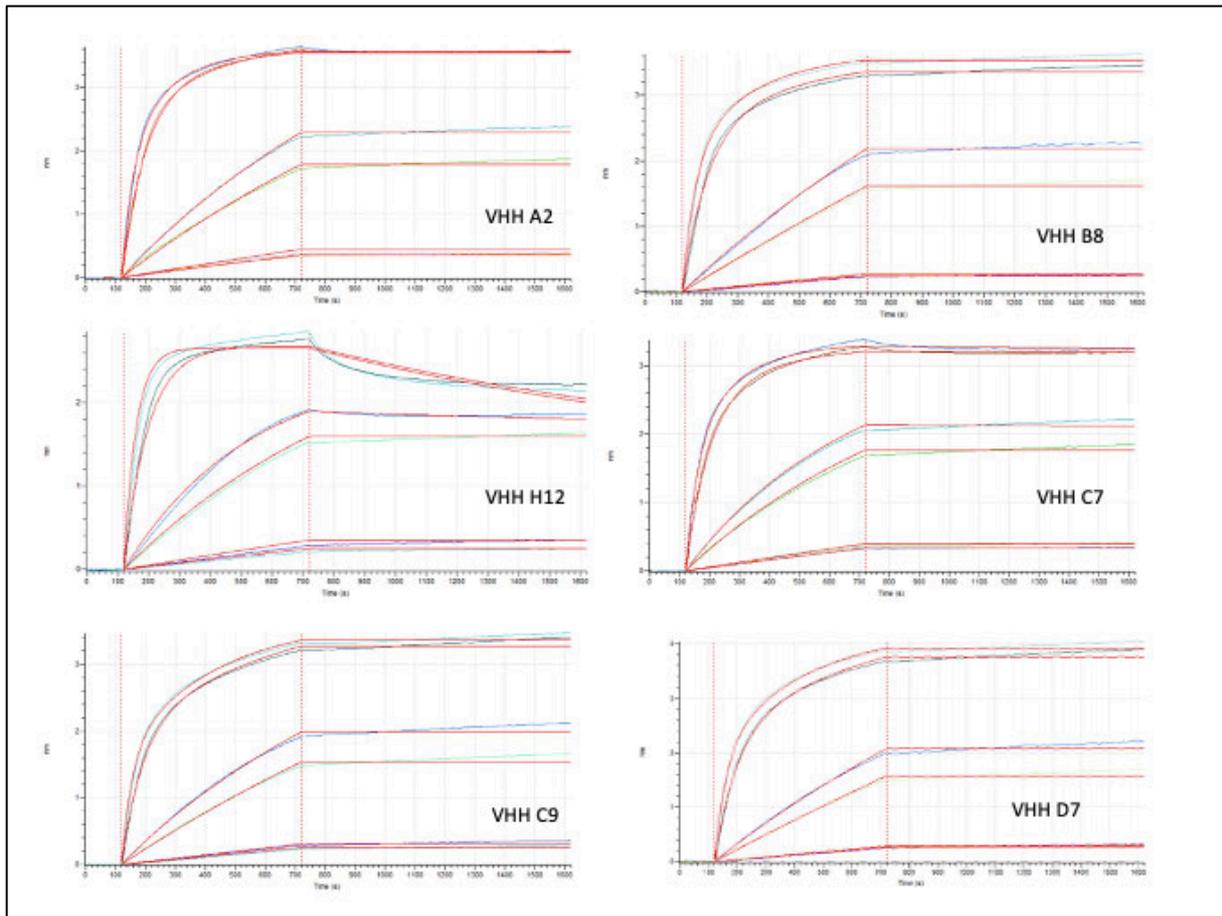


Figure 47 : Courbe d'association et de dissociation entre les VHH et ILT4-hFc.

Mesures réalisées par la méthode d'Interférométrie Bio-couche (Octet HTX). Les VHHs ont été immobilisés par liaison amine sur des senseur NHS (Sartorius) puis incubés dans des solutions contenant l'ILT4-hFc en solution à différentes concentrations. Les courbes ont ensuite été analysées avec le logiciel Octet dans un modèle 2 :1.

Matériel et Méthodes

I. Génération des VHH anti-ILT4

Cette étape du projet a été réalisée avant le début de ma thèse, par le Dr. Pierre Lafaye et le Dr. Gabriel Aymé, respectivement Directeur de recherche et Ingénieur de recherche à la Plateforme d'Ingénierie des Anticorps de l'Institut Pasteur. Les différentes étapes antérieures à mon arrivée seront donc résumées succinctement et le protocole détaillé d'obtention de VHH à partir d'une banque immunologique est disponible dans l'article (Gransagne et al. 2022).

a. Immunisation d'un alpaga

Toutes les procédures sur les alpagas sont exécutées selon la législation française (2013-118, 6/02/2013) et en accord avec la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil. Un alpaga a été immunisé par injection sous cutané d'une émulsion contenant la protéine recombinante ILT4-hIgG1-Fc (T4-2078, R&D Systems) diluée dans l'adjuvant complet de Freund. Deux injections ont ensuite été réalisées avec l'adjuvant de Freund non complet, 21 et 28 jours suivant la primo injection.

b. Isolation des lymphocytes

La dernière immunisation effectuée, environ 400 mL de sang ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire de l'alpaga. Le sang a ensuite été traité afin d'en extraire les lymphocytes pour réaliser la banque d'ADNc codant pour les régions VH des anticorps. Après dilution dans du milieu de culture MEM (Gibco), les différentes fractions sanguines ont été séparées par centrifugation sur gradient de Ficoll. Deux fractions ont été récupérées : le sérum, à partir duquel un test ELISA sera réalisé pour valider la présence d'anticorps anti-ILT4 et l'anneau de cellules lymphocytaires à partir desquels sera générée la banque immunologique.

c. Génération de la librairie de phages

L'ARN total des lymphocytes isolés à l'étape précédente a été extrait grâce à un Kit d'extraction d'ARN (Qiagen) puis les ADN complémentaires (ADNc) ont été générés par transcription inverse

(Transcriptase reverse Superscript II, Invitrogen) en utilisant un random hexamer (Thermofisher).

L'objectif des deux PCR successives réalisées à partir des ADNc fut d'une part d'amplifier la séquence codant pour les régions VH des anticorps et d'autre part d'ajouter aux extrémités 5' et 3' des amplicons les sites de restriction enzymatique pour le clonage dirigé dans le phagemide pHEN6.

La PCR1 fut réalisée avec des couples d'amorces spécifiques des régions conservées en amont de la région VH et dans la région CH2, amplifiant ainsi les régions VHH-Hinge-CH2 des anticorps homodimériques (600 à 700 pb) et VH-CH1-Hinge-CH2 des anticorps hétérodimériques. (900 à 1000 pb). Les régions conservées des VH présentent de petites variations de séquences, donc afin d'augmenter la diversité de la banque, 5 couples d'amorces furent utilisés pour la PCR. La séparation des deux types d'amplicons générés a été ensuite réalisée par migration sur gel d'agarose et seules les bandes correspondant aux VHH (600-700 pb) furent extraites. L'étape de PCR1 est illustrée ci-dessous par la Figure 48, adaptée de Muyldermans 2021, FEBS.

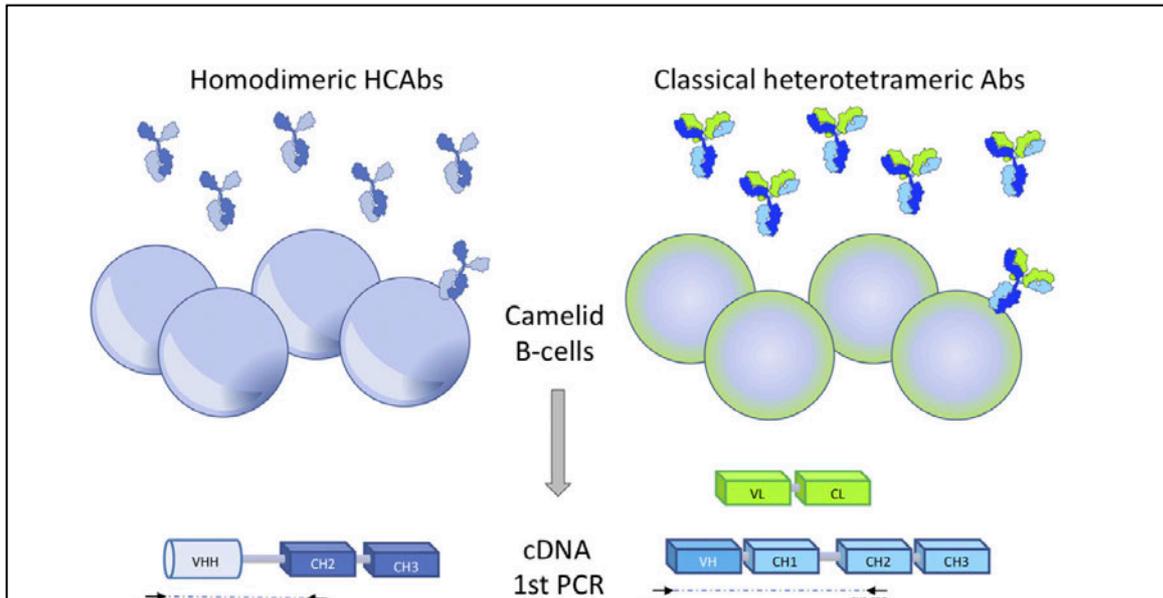


Figure 48 : Illustration de la PCR 1 pour la génération des ADNc des régions VH/CH2 des anticorps

La PCR2 fut réalisée sur les amplicons de PCR1 extraits du gel. Les couples d'amorces utilisées permettaient ici l'amplification de la région VHH et l'ajout des sites de restriction enzymatiques

SfiI en 5' et NotI en 3'. Les amplicons obtenus, d'environ 400 pb, furent ensuite purifiés (PCR clean-up kit, Macherey Nagel) et clonés dans le vecteur phagemidique pHEN6 après digestion SfiI/NotI et ligation (Ligase T4, NEB). Le plasmide a été au préalable déphosphorylé (Antartic Phosphatase, NEB).

Les bactéries *Escherichia coli* TG1 furent transformées avec les produits de ligation pHEN6-VHH par électroporation (Biorad) et la banque ainsi obtenue a été conservée à -80°C. Afin d'estimer la diversité génétique de la banque, une PCR a été réalisée sur une vingtaine de colonies bactériennes isolées et les produits de PCR séquencés pour confirmer la diversité de la banque.

d. Production des phages

Le vecteur pHEN6 contient un gène de résistance à l'ampicilline, et deux origines de réplication : l'une bactérienne et l'autre virale spécifique de la souche de phage M13. Cette souche de bactériophage a la particularité d'infecter les bactéries sans les lyser. Le clonage directionnel SfiI/NotI dans le vecteur pHEN6 permet l'expression des VHH en phase avec la protéine de phage pIII, protéine exprimée à l'extrémité des particules virales.

Afin de produire ces particules virales, les bactéries TG1 de la banque ont été cultivées en milieu 2YT complet supplémenté avec de l'ampicilline et glucose 1%. Une fois en phase exponentielle de croissance, les bactéries furent transformées avec le M13 Phage Helper (M13K07, NEB). Ce vecteur contient une origine de réplication virale, un gène de résistance à la kanamycine, et les gènes codant pour les protéines virales. En présence du vecteur phagemidique, des particules virales contenant le VHH fusionné à la protéine pIII ont ainsi été produites. La structure des phages ainsi obtenus est illustrée dans la Figure 49 suivante adaptée de (Lee et al. 2007).

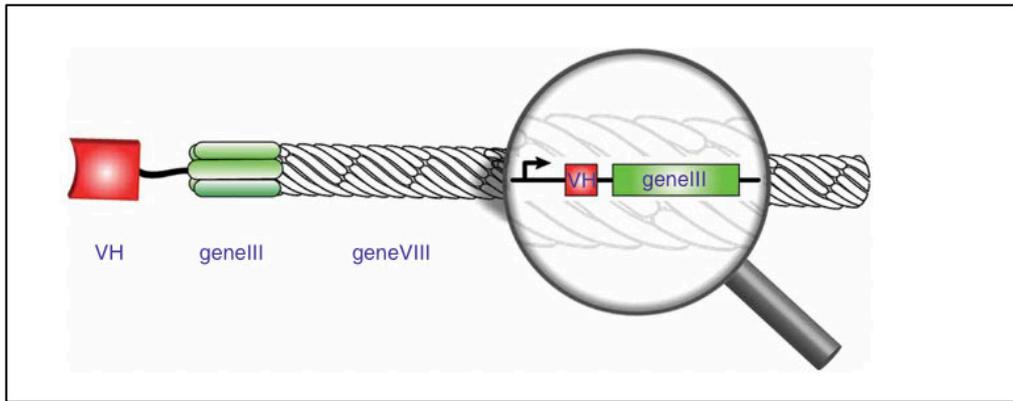


Figure 49 : Illustration de la structure d'un phage exprimant un VHH.

Les bactéries infectées ont ensuite été incubées sur la nuit à 30°C sous agitation en présence d'ampicilline, de kanamycine et d'IPTG 1 m. Ce dernier composé est un analogue du lactose qui active la transcription de l'opéron lactose, qui contrôle l'expression des VHH sur le vecteur pHEN6. Le lendemain, le surnageant de culture fut récolté et les phages précipités par incubation à 4°C avec 20% v : v de PEG/NaCl. Les phages ont été lavés et les débris bactériens éliminés par des étapes successives de centrifugation et de suspension dans une solution de PEG/NaCl puis PBS.

e. Criblage de la banque et sélection des VHH spécifiques d'ILT4 par phage display

L'étape de criblage a pour objectif d'isoler les phages contenant la séquence codant pour les VHH spécifiques de la cible, ILT4.

Pour cela, 3 cycles de criblage, ou panning en anglais ont été réalisés, le premier à partir de la banque immunologique, et les deux suivant à partir des clones sélectionnés lors du panning 1 puis du panning 2.

Dans le cas précis de la génération des VHH anti-ILT4, des étapes successives de sélection négative puis positive ont été réalisées. En effet, la protéine utilisée pour l'immunisation de l'alpaga était une protéine chimérique de l'ILT4 fusionnée à la région Fc de l'IgG1 humaine. Une étape de déplétion des VHH spécifiques de la région Fc a donc été nécessaire avant de réaliser le criblage positif sur la protéine ILT4-hIgG1-Fc.

Pour ce faire, à chaque cycle de panning, les phages ont été dilués dans un tampon de blocage (PBS tween 0,1% + protéine de blocage) et incubés pendant 1h à TA sous agitation dans des immunotubes (Dutscher, 05523) coatés avec un anticorps humain IgG1. A chaque tour de

panning, un agent bloquant différent (gélatine, BSA ou protéines de lait) fut utilisé pour éliminer les VHH « collants » qui interagissent de façon non-spécifique avec d'autres protéines. Après la première incubation, les phages en suspension ont été récupérés dans le surnageant et incubés de nouveau dans des immunotubes IgG1-Fc. Cette étape de déplétion a été réalisée trois fois, puis les phages ont été incubés dans des immunotubes coatés avec l'ILT4-hIgG1-Fc pendant 1h à température ambiante (TA). Les phages spécifiques d'ILT4 ont été décrochés de leur cible par élution basique.

Ces phages spécifiques ont ensuite été utilisés pour infecter des bactéries TG1. L'entrée des bactériophages dans les bactéries E. coli a lieu à la suite de leur interaction avec le F-Pilus de la bactérie. Ceci permet donc en théorie l'infection d'une bactérie par un unique phage, et donc la génération de clones bactériens contenant une seule séquence de VHH.

A la fin de chaque cycle de panning, de nouvelles bactéries TG1 ont été cultivées en suspension dans du milieu complet, et ont été infectées par les phages-VHH élués (pour 10 mL de culture). A partir de ces cultures bactériennes, des Phage-VHH ont de nouveau été produits et soumis à un nouveau cycle de panning, comme décrit précédemment.

A la suite du 2ème et 3ème cycle de panning, 10 µl de la culture bactérienne fut diluée entre 10⁻² et 10⁻⁶ et étalée sur des boîtes de 2YT gélosée avec de l'ampicilline, afin d'obtenir des colonies isolées. Après culture sur la nuit à 37°C, les clones isolés ont été repiqués en plaques 96 puits contenant 200 µL de milieu 2YT/ampicilline. Les particules virales furent produites par ajout de Phage Helper comme précédemment expliqué. Les phages-VHH produits ont été récoltés dans le surnageant de culture et testés en ELISA pour vérifier la spécificité du VHH exprimé à leur surface. Brièvement, la protéine ILT4-IgG1Fc fut immobilisée dans une plaque ELISA (NUNC Maxisorp). Entre chacune des étapes de l'ELISA, un lavage en tampon PBS-Tween 0,1% a été réalisé. Le SN contenant les phages-VHH a été incubé dans les puits, et la présence de phage-VHH fixé à l'ILT4 après lavage fut révélée par incubation avec un anticorps anti-M13-HRP. Les clones positifs ont été récupérés de la plaque de culture 96 puits, l'ADN plasmidique fut extrait et analysé par séquençage (prestataire Eurofins). Les séquences des VHH obtenus ont ensuite été analysées et classées par homologie.

II. Méthodes de production et purification des protéines recombinantes

1) Design et construction des vecteurs d'expression

a. VHH bivalent fusionné à une région Fc (VHH-Fc)

La séquence codant pour les VHH a été extraite du plasmide d'expression bactérienne pET23 ou pHEN6 par digestion enzymatique avec les enzymes NcoI et NotI (NEB), en 5' et 3' respectivement. Le clonage a été réalisé par ligation (Ligase T4, NEB) dans le vecteur pFuse (Invivogen). Ce clonage permet l'expression en phase du VHH fusionné à la région Fc dont la séquence est présente sur le vecteur pFuse. Deux versions de ce vecteur ont été utilisées, l'une contenant la séquence codant pour la région Fc des IgG1 humaines et l'autre des IgG2c murines.

b. VHH dimère

Cette construction a été réalisée dans le cadre d'une collaboration par le Dr. Nicolas Escriou au laboratoire d'Innovation vaccins de la façon suivante : la séquence codant pour le VHH B8 a été modifiée, grâce à la redondance du code génétique, afin d'obtenir une nouvelle séquence nucléotidique différente de la séquence d'origine mais codant pour la même protéine. Cette étape est nécessaire pour éviter la recombinaison homologue des séquences identiques et permettre la synthèse du gène suivant « VHH-B8_linker (GGGGS)5_VHH-B8 ». Le gène a été synthétisé par GeneArt (Thermofisher) et sous cloné dans le vecteur pFuse par la méthode précédemment décrite.

c. HLA-G6-mFc

Le vecteur d'expression de la protéine HLA-G6 (UniProt, P17693-6) a été précédemment généré par Invectys et contient la séquence codant pour la protéine fusionnée en C-terminal aux tags HisTag-V5. Par PCR, la séquence codant uniquement pour HLA-G6 a été extraite à partir de ce plasmide et les sites de restriction NcoI/Not I ont été ajoutés en 5' et 3' respectivement, en utilisant les amorces suivantes :

- HLA-G6 NcoI CC_Fw : TATTGCACCATGGCCGCTGGATCTCACTCCATGAGG
- HLA-G6 NotI_Rev : AGATCTAGCGGCCGCCAG

L'amorce en 5' contient également deux bases C en aval du site NcoI, ce qui permet le clonage de HLA-G6 en phase avec la séquence CH2-CH3 d'IgG2c murin sur le vecteur pFuse. La séquence néo-synthétisée fut ensuite clonée dans le vecteur pFuse par la stratégie précédemment décrite.

d. Domaine extracellulaire d'ILT4 (nommé ILT4-ECD)

La séquence correspondant au domaine extracellulaire de l'ILT4 a été déterminée à partir de la base de données UniProt (Q8N423, Gly24-His458) et correspond à la séquence utilisée par R&D Systems pour produire la protéine chimérique ILT4-hFc utilisée pour l'immunisation de l'alpaga. La construction comprend : la séquence codant pour l'ECD d'ILT4 fusionnée à la séquence du site de clivage par la protéase du Tobacco Etch Virus (TEV, site de clivage ENLYFQS), un tag FLAG de détection et un HisTag pour la purification. Deux constructions ont été synthétisées par GeneArt (ThermoFisher) : l'une avec la séquence TEV/Tags en N-terminal de l'ILT4-ECD et l'autre en C-terminal. Le sous-clonage dans le vecteur pFuse a été réalisé comme précédemment décrit. Dans ce cas précis, un codon STOP a été ajouté en C-terminal, ce qui permet l'expression de la protéine ILT4-ECD non-fusionnée à la région Fc.

e. Transformation bactérienne et purification des vecteurs plasmidiques

Après l'étape de ligation de l'insert dans le plasmide par la ligase T4, les bactéries Escherichia Coli XL1 (Agilent) chimiocompétentes ont été transformées avec le produit de ligation et les bactéries résistantes furent sélectionnées par culture avec l'antibiotique approprié. L'ADN plasmidique nécessaire aux étapes de transfections cellulaires a été purifié par les méthodes d'extraction d'ADN sans endotoxines (NucleoBond Xtra Maxi EF, Macherey-Nagel).

2) Méthodes de production des protéines recombinantes

1) Production en cellules Expi293™

Les productions de protéines recombinantes sont réalisées par mes soins à la Plateforme de Production et Purification de Protéines Recombinantes de l'Institut Pasteur, dirigée par Stéphane Pétres.

Le système d'expression mammalien Expi293™ a été mis au point par Thermofisher. Les cellules de la lignée HEK293 (Human Epithelial Kidney) ont été optimisées pour la production de protéines recombinantes en suspension, dans un milieu chimiquement défini qui contient tous les éléments nécessaires à la croissance des cellules sans supplémentation en sérum de veau fœtal (SVF). La culture cellulaire et les productions ont été réalisées selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les cellules en suspension ont été maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, 8% de CO₂ et sous agitation dans des shake flasks (Corning). La production des protéines par transfection transitoire des cellules fut réalisée en culture « fed-batch » sur 4 à 5 jours. L'ADN complexé à l'Expifectamine293™ a été préparé au ratio de 1 µg d'ADN par mL de culture cellulaire. La viabilité et la croissance des cellules en production ont été mesurées par comptage au bleu trypan, et les cellules ont été séparées du surnageant de culture par centrifugation lorsque la viabilité a diminué à 60% ou moins. Le surnageant obtenu à la suite de la centrifugation et contenant le milieu de culture cellulaire fut filtré sur une membrane PES 0,22 µm avant purification. Pour le cas particulier de la production de HLA-G6-mFc (voir Résultat Annexe 1) le culot cellulaire a été re-suspendu dans un de tampon de lyse Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton-X 100 1% + inhibiteurs de protéases (Roche) et incubé sous agitation à 4°C pendant 30 min. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et le surnageant filtré à travers une membrane PES 0,22 µm.

2) Production en bactéries Escherichia Coli (périplasme ou cytoplasme)

Les VHH monomériques ont été produits dans des bactéries Escherichia Coli TG1 ou BL21. Les bactéries transformées ont été cultivées dans le milieu 2YT (+ampicilline) et l'expression des VHH fut induite par l'ajout d'IPTG en phase de croissance exponentielle. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation après environ 24h de production. Pour les productions périplasmiques (vecteur d'expression pHEN6), les bactéries ont été lysées dans un tampon PBS NaCl avec 1 mg/mL de polymixine B, un antibiotique qui perfore la membrane périplasmique. Pour les productions cytoplasmiques (vecteur d'expression pET23), les bactéries ont été broyées mécaniquement (Broyeur de cellules, CellID). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et les VHH purifiés (voir partie Purification des protéines recombinantes).

Production en bactéries		Production en Expi293™	
Périplasma	Cytoplasme	Secrété	Intracellulaire
VHH anti-ILT4	VHH isotype (anti protéine β -amyloïde)	VHH-Fc, VHH-VHH, ILT4-ECD	HLA-G6-mFc

Tableau 4: Tableau récapitulatif des modes de production des différentes protéines recombinantes

2) Méthodes de purification des protéines recombinantes

1) Purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC)

Brièvement, le principe de cette purification par chromatographie d'affinité des protéines contenant un HisTag repose sur l'affinité entre la séquence d'acides aminés poly-Histidine et des cations métalliques comme le cobalt (Co^{2+}) et le nickel (Ni^{2+}). Les protéines HisTag sont captées par ces cations, fixés de façon covalente à un support physique, lors de l'application de l'échantillon. Des étapes de lavage en tampon d'équilibration (Tris ou PBS NaCl, pH 7,4 ou 8) permettent de d'éliminer une partie des protéines contaminantes. Les protéines d'intérêt sont éluées de par compétition avec l'imidazole contenu dans le tampon d'éluion. Un gradient de concentrations croissantes d'imidazole (entre 5 mM et 500 mM) permet de décrocher des protéines contaminantes avant de décrocher les protéines d'intérêt.

Deux méthodes ont été utilisées : la purification en batch avec des billes d'agarose-cobalt (Iba) et la purification en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur colonnes HisTrap (Cytiva) connectées à l'instrument Akta Pure. Pour des VHH produits en bactéries, une étape de lavage à 4°C avec un tampon contenant 1% de Triton X-114 a été ajouté avant l'éluion pour éliminer les endotoxines. L'absence d'endotoxines a ensuite été vérifiée (Kit LAL, Thermofisher).

2) Purification par chromatographie d'affinité sur protéine G

Cette technique repose sur l'affinité de la protéine G pour la région Fc des anticorps IgG. Après lavage à l'eau et équilibration de la colonne dans le buffer d'équilibration PBS NaCl 500 mM,

les échantillons contenant la protéine d'intérêt ont été injectés sur la colonne (HiTrap Prot G, Cytiva) connectée à la HPLC (Akta Pure). Une étape de lavage au tampon d'équilibration fut alors réalisée, puis la protéine a été éluée par changement de pH avec une solution d'éluion acide de glycine 0,1 M à pH 2,5. Le pH des éluions a été immédiatement ajusté avec une solution de Tris HCl 0,1 M pH 8.

3) Purification par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

La chromatographie d'exclusion de taille permet de séparer des protéines en fonction de leur poids moléculaire apparent. Nous avons utilisé cette technique pour améliorer le niveau de pureté des protéines après purification par chromatographie d'affinité, en éliminant des protéines contaminantes. En fonction de la taille de la protéine à isoler, une colonne Hiload Superdex 16/600 75 pg ou 200 pg (Sigma) est reliée à la HPLC (Akta Pure). Les échantillons sont concentrés par ultrafiltration (Vivaspin, Sartorius) jusqu'à un volume maximal de 5 mL, correspondant au volume de la boucle d'injection de l'Akta Pure. Tous les pics d'absorbance à 280 nm supérieurs à 5 mAu sont récoltés et analysés.

4) Couplage des VHH au fluorochrome Phycoérythrine (PE)

Cette technique repose sur la formation d'une liaison amine entre un résidu NH₂ d'acide aminé et un groupe ester réactif situé sur la molécule R-Phycoérythrine (PE).

Le VHH B8-mFc a été incubé avec la PE à un ratio molaire défini par les recommandations fournisseur (R-Phycoérythrine Labelling Kit NH₂, Dojindo). Après incubation 1h à TA sous agitation, les sels et la PE en excès ont été éliminés par plusieurs bains de dialyse successifs de 8h (Cassette de dialyse Thermofisher, Slide-a-lyser 10 kDa MWCO) dans un tampon PBS NaCl à 150 mM.

II. Méthodes de caractérisation biochimique des protéines

1) Analyse des protéines par SDS PAGE et immunoblots

1) *SDS-PAGE*

Pour les analyses en conditions réductrices, les échantillons ont été réduits et dénaturés dans une solution de LDS et β -mercapto-ethanol. Pour les analyses en conditions dénaturantes mais non réductrices, seul le tampon LDS a été utilisé. Les échantillons ont ensuite été incubés à 90°C 5 min avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide avec un gradient de 4% à 12% (Thermofisher). Le gel a été immergé dans la cuve d'électrophorèse dans un tampon de migration MES ou MOPS et les protéines séparées par l'application du courant électrique. Pour la coloration des protéines totales, le gel a été rincé à l'eau et incubé 1h à TA en bleu de Coomassie.

2) *Immunoblots*

Pour les immunoblots, le gel a été rincé à l'eau après la migration, et les protéines transférées sur une membrane de PVDF par transfert semi-aqueux (Midi-Gel Biorad). L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration au Rouge Ponceau des protéines fixées sur la membrane. La membrane a ensuite été rincée dans du PBST 0,1% lait 5% pour éliminer le rouge et incubée dans cette solution de blocage 30 min à TA. La membrane a ensuite été incubée avec une solution PBST/lait contenant un anticorps de détection spécifique à la protéine recherchée, et un anticorps secondaire couplé à la HRP spécifique de l'anticorps primaire. La membrane a été révélée par incubation dans une solution contenant le substrat de l'enzyme HRP (West Pico ou Femto, Thermofisher). Tous les anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans le tableau 5 à la fin de cette section Matériel et Méthodes.

3) Mesures d'affinité par Interférométrie Bio-couche (BLI)

La détermination de la force d'interaction entre deux protéines par Biolayer Interferometry (Octet HTX, Forte Bio) repose sur une mesure de différence d'intensité lumineuse. L'une des protéines est immobilisée sur une surface plane d'un senseur, plongé dans une solution contenant l'autre protéine soluble. Un faisceau lumineux est ensuite dirigé sur cette surface

puis renvoyé vers un capteur optique, qui convertit l'intensité lumineuse en intensité électrique. La présence de biomolécules en interaction à la surface du senseur interfère avec le rayon lumineux. C'est donc la différence d'intensité entre le rayon émis et le rayon renvoyé qui nous permet de mesurer l'affinité de l'interaction.

La mesure de l'affinité entre les VHH générés et l'ILT4-hFc a été mesurée avec les paramètres suivants : les VHH-HisTag ont été immobilisés sur un senseur par couplage NHS (Sartorius, FortéBio) à concentration fixe, puis les senseurs ont été incubés dans une solution physiologique contenant des concentrations croissantes d'ILT4-hFc. Cette étape a permis de mesurer la constante d'association, puis l'incubation dans une solution dépourvue d'ILT4-hFc a permis de mesurer la constante de dissociation. Les valeurs obtenues ont été analysées par le logiciel Bio Forte, dans un modèle 2 :1.

4) Méthodes d'analyse de l'interaction entre protéines par ELISA

Tous les ELISA ont été réalisés dans des plaques 96 puits NUNC™ (Thermofisher, 469949) ou Pierce™ ReactiBind (Thermofisher, 10563364) selon les étapes suivantes :

1. Coating (immobilisation des protéines) : sur la nuit à 4°C, dans un volume final de 100 µl de PBS
2. Lavages : entre chaque étape, 3x 200 µl de PBS Tween 0.1 % (PBST)
3. Blocage : 30 minutes à 1h dans 100 µL de PBST gélatine 0.5% (PBSTG)
4. Incubation : 1h à 37°C
5. Révélation : ajout de 100 µL de substrat OPD (Sigma) et incubation entre 10 à 30 minutes, dans l'obscurité.
6. Neutralisation de la HPR : ajout de 50 µL d'HCl 3 N
7. Mesure de l'absorbance à 492 nm (Sunrise, Tecan)

Dans les parties suivantes sont illustrés tous les designs des ELISA mis au point pendant cette étude, avec des précisions concernant les éléments spécifiques de chaque ELISA.

5) Courbe de fixation des VHH sur ILT4 (ELISA indirect)

Des dilutions en série de chaque VHH ont été réalisées dans les puits de la plaque ELISA, dans un volume final de 100 μ L de PBSTG. Après 1h d'incubation à 37°C et lavage, 100 μ L d'anticorps secondaire ont été ajoutés dans les puits. Les anticorps ont été préalablement dilués aux concentrations recommandées par le fournisseur, dans une solution de PBSTG.

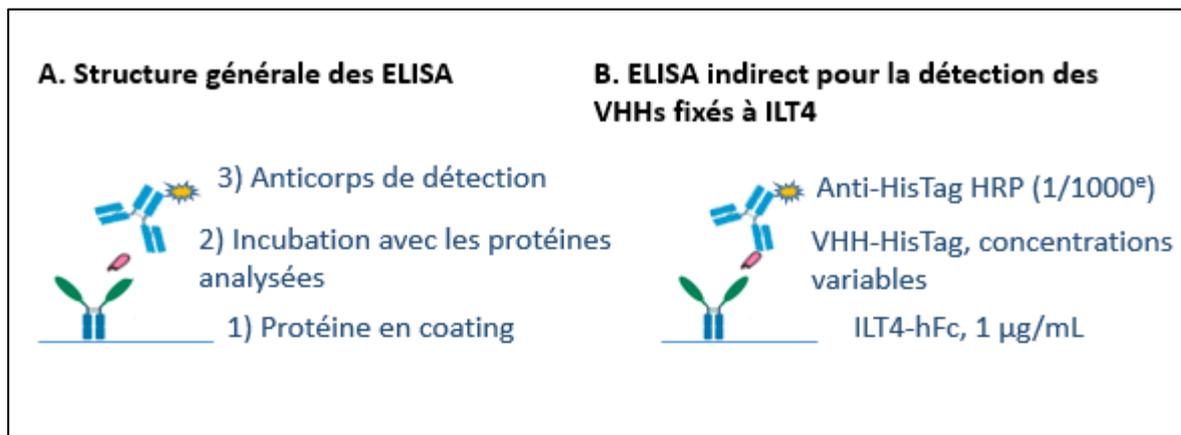


Figure 50 : Représentation des ELISA.

- A. La structure générale des schémas des ELISA réalisés
- B. La structure de l'ELISA pour déterminer les courbes de fixation des VHH à l'ILT4

6) Réactivité croisée avec ILT2 et PIR-B (ELISA indirect)

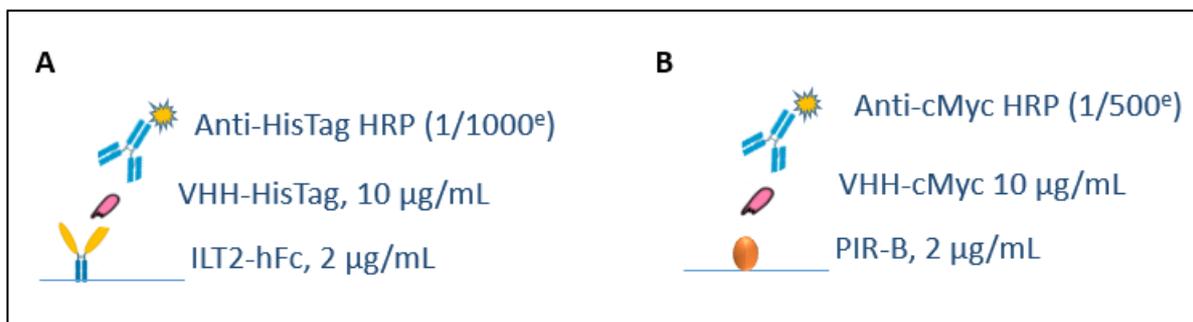


Figure 51 : ELISA indirect pour évaluer la réactivité croisée des VHH pour ILT2 ou PIR-B.

- A. ELISA pour évaluer la réactivité croisée pour ILT2.
- B. ELISA pour évaluer la réactivité croisée pour PIR-B.

Le système de détection utilisé n'était pas le même dans les deux ELISA, car la protéine PIR-B possède un HisTag. Des contrôles expérimentaux ont été ajoutés : un coating avec ILT4-hFc et la détection d'ILT2 et PIR-B par des anticorps spécifiques.

agents précipitants majoritairement employés sont les polyéthylène glycol (PEG) à différent poids moléculaire, les sels, et les solvants organiques volatiles ou non (McPherson et al. 1982) (Bergfors et al. 1999).

La formation de cristaux a lieu dans un espace défini par la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, comme illustré dans la figure 53 (adaptée de Dessau et al, 2011) suivante :

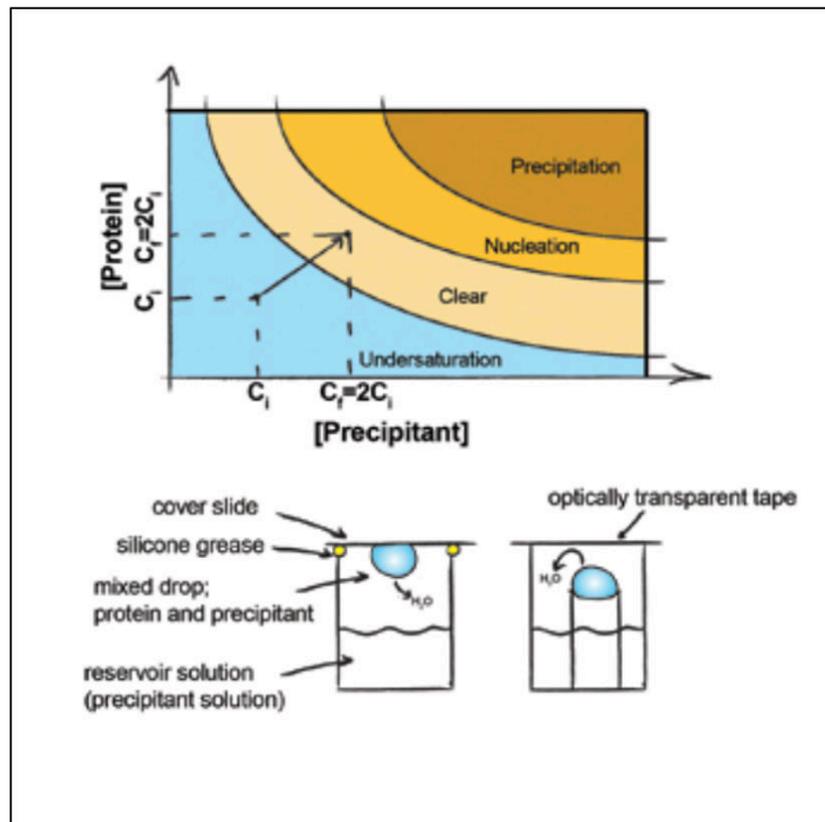


Figure 53 : Principe de la cristallisation des protéines par méthode de diffusion de vapeur en gouttes assises

Un volume égal de protéine et de solution de précipitation sont mélangés. L'eau s'évapore de la solution, augmentant la concentration de l'échantillon, jusqu'à la mise en place d'un équilibre entre la goutte et la solution contenue dans le puits.

Les protéines ILT4-ECD et B8 ont été produites et purifiées selon les méthodes précédemment décrites. Pour générer le complexe ILT4-ECD et B8, les protéines ont été co-incubées à un ratio molaire de 1 :2 (6 mg ILT4 pour 1,5 mg VHH-B8) à 4°C sous agitation sur la nuit. Le complexe a été ensuite purifié par chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Les pics d'élution ont été

analysés par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, et les fractions d'éluion correspondantes au complexe ont été regroupées et concentrées jusqu'à 6,6 mg/mL à l'aide de Vivaspin Ultrafiltration Units Cut off 10kDa de chez Sartorius) et transmises directement à la plateforme de cristallographie pour effectuer extemporanément le criblage de cristallisation haut débit. Pour effectuer ce criblage haut débit, nous avons suivi les protocoles et les procédures mises en place par la plateforme de cristallographie (Weber et al. 2019).

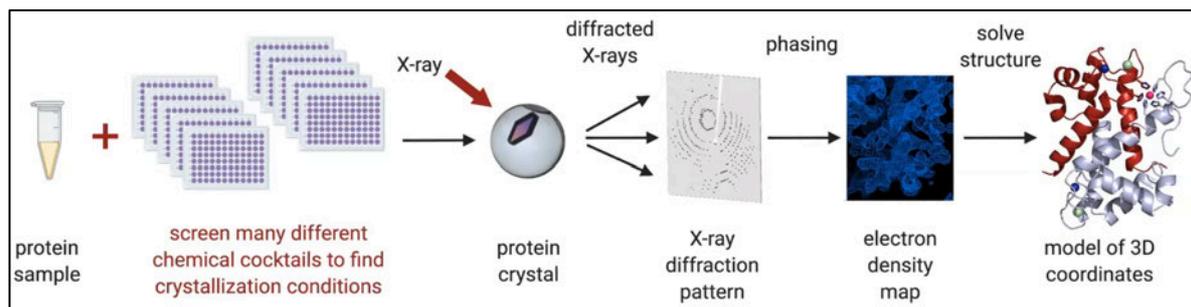


Figure 54 : Processus de détermination de la structure tridimensionnelle d'une protéine par cristallographie

Brièvement, les essais de criblage à 18 °C sont effectués par le robots Mosquito (TTP Labtech, Melbourn, Royaume-Uni) en utilisant la méthode de diffusion de vapeur en gouttes assises. Le volume de la goutte de cristallisation est de 400 nl, avec un mélange 1:1 de l'échantillon de protéine et de différentes solutions de criblage. Typiquement, une goutte de 200 nl de l'échantillon de protéine est distribuée dans le sous-puits de la plaque de cristallisation avant d'ajouter une goutte de 200 nl de solution de cristallisation. Au total nous avons généré 9 plaques de cristallisation en testant les kits de cristallisation suivant : Crystal Screen 1&2, Salt RX, PEGion, Index, Crystal Screen CRYO 1&2 (Hampton), Wizard 1&2 (Emerald Biosystems) Structure screen 1&2 (Molecular Dimensions Limited) JBS1 to JBS4 and JBS5 to JBS8 (Jena Bioscience). Chaque plaque est scellée manuellement avec du ruban transparent (CrystalClear HR4-506, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) pour éviter l'évaporation et centrifugée à 1000 rpm/min pendant 10 min pour assurer un mélange suffisant de l'échantillon de protéine et de la solution de cristallisation correspondante. Ces plaques sont par la suite stockées dans le robot de stockage et de visualisation des gouttes (RockImager 1000, Formulatrix, Bedford, MA, États-Unis) pour surveiller la croissance cristalline. Ce système maintient les plaques à température constante (18°C) et permet une prise de photo automatique sur chaque goutte

de cristallisation. Cette prise de vue périodique de gouttes individuelles sur chaque plaque est effectuée pour surveiller le processus de cristallisation. Les images collectées sur chaque goutte de cristallisation sont transférées vers une base de données serveur (WebMaker) associée au système d'imagerie (Formulatrix RockImager 1000). J'ai personnellement pris en charge l'inspection et l'évaluation des images pour détecter les pistes de cristallisation intéressantes. Lorsque des monocristaux de taille appropriée ($> 20\mu\text{m}$) sont obtenus à partir des essais de criblage initiaux, ils sont directement pêchés et congelés sous azote liquide pour l'analyse par diffraction des rayons X. Pour les cristaux de protéines qui diffractent à haute résolution, un jeu de données complet peut alors être collecté sur les lignes de lumières de cristallographie (Proxima1 et Proxima2A) du synchrotron SOLEIL (Saclay, France).

III. Études fonctionnelles des VHH sur cellules in vitro

1) Culture cellulaire

Les lignées H1299 (ATCC), A549 (ATCC, ECACC et provenant de différents laboratoires de l'Institut Pasteur) et LCL (ATCC) ont été utilisées dans cette étude. Les H1299 adhérentes et les cellules LCL en suspension ont été cultivées en milieu RPMI supplémenté à 10 % en SVF et 1% pénicilline/streptomycine (PS). Les A549 adhérentes ont été cultivées en milieu F-12 supplémenté avec 10% de SVF et 1% de Pénicilline et Streptomycine (P/S).

Les cellules ont été maintenues en culture dans un incubateur humide à 37°C, 5% CO₂ avec un rythme de passage 2 à 3 fois par semaine en fonction de la confluence cellulaire. Pour le passage des lignées adhérentes, le tapis cellulaire a été rincé avec du PBS avant ajout de trypsine-EDTA 0,25% suivi d'une incubation pendant 5' à 37°C. L'action de la trypsine a été neutralisée par l'ajout de 10 volumes de milieu complet et les cellules ont été décollées du support par aspiration-refoulement. A chaque passage, si le volume de suspension cellulaire à ensemercer dépassait 10% du volume final, les cellules ont été centrifugées et le culot resuspendu dans du milieu spécifique complet frais.

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par gradient de Ficoll à partir de poches de sang de donneurs sains provenant de l'Établissement Français du Sang (EFS).

2) Analyses par cytométrie en flux

Les cellules ont été récoltées selon les méthodes de culture cellulaire précédemment détaillées. L'équivalent de 300.000 cellules par conditions ont été prélevées, centrifugées et rincées avec du PBS. Elles ont ensuite été re-suspendues en PBS et 300.000 cellules ont été distribuées dans 50 µL dans les puits d'une plaque 96 puits à fond U. Les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps de détection spécifique de l'antigène à étudier et dans les conditions recommandées par les fournisseurs.

Pour les expériences de compétition entre la protéine recombinante HLA-G6-mFc et les trois formats de VHH B8 pour la fixation à l'ILT4 à la surface des cellules H1299-ILT4, les cellules ont été pré-incubées 5 minutes avec les différentes concentrations pour les constructions B8 testées, puis avec HLA-G6-mFc (15 µg/mL). La présence de HLA-G6-mFc a ensuite été détectée par un anticorps secondaire anti-souris H+L couplé au FITC (Invitrogen). Le format B8-Fc humain a été utilisé dans ces tests, pour éviter une réactivité avec l'anticorps de détection.

Le cytomètre MAQS Quant 16 (Miltenyi Biotech) a été utilisé pour l'analyse des cellules et les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

3) Génération de la lignée H1299-ILT4+

La lignée H1299 de cellules de carcinome de poumons humain a été transduite par Martin Lecomte à Invectys, avec un lentivirus contenant l'ADNc codant pour le gène ILT4 (base de données Ensembl, référence ENST000000314446.1). Brièvement, les particules virales ont été obtenues par triple transfection de cellules HEK293T par les vecteurs pTrip-ILT4, pCMVR8.74 et pVSV-G. Ces trois plasmides contiennent les gènes nécessaires à la génération des particules virales contenant le gène codant pour l'ILT4 sous le contrôle du promoteur viral EF1 α . Après transduction des cellules H1299, l'expression d'ILT4 à leur membrane a été analysée par cytométrie en flux par marquage avec l'anticorps de référence 42D1-Pe (Invitrogen).

4) Modèle de macrophages M1-like et M2-like

Les PBMCs ont été triés avec des billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-CD14 (Miltenyi) pour sélectionner et isoler les cellules monocytaires CD14+. Après vérification de la

pureté de l'échantillon par cytométrie en flux, les monocytes ont été ensemencés en plaque 96 puits dans du milieu de culture RPMI complet (10% SVF + 1% P/S). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 7 jours avec les cytokines de différenciation (GM-CSF / IFN γ / LPS pour les M1; M-CSF / IL-4 pour les M2) et les anticorps testés aux temps indiqués sur le calendrier présenté en Figure 53. A chaque ajout de cytokines, le milieu a été remplacé. Les constructions monomériques B8, dimériques B8-B8 et un VHH contrôle ont été testés aux concentrations de 0,1 nM 1 nM, 10 nM et 100 nM.

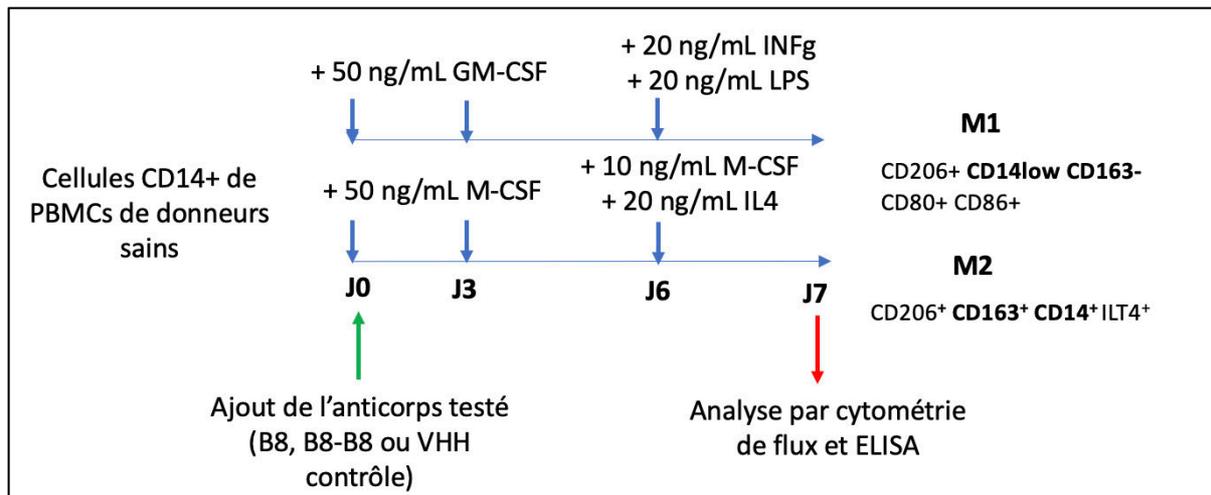


Figure 55 : Protocole de différenciation des monocytes en macrophages M1 ou M2

L'expression des marqueurs de surface spécifiques aux phénotypes M1 ou M2 a été analysée à la fin du protocole de différenciation par cytométrie en flux. Le surnageant de culture des macrophages M2 a été récolté et analysé en ELISA pour mesurer la présence et la quantité des différentes interleukines (Human uncoated ELISA Kit, Invitrogen) pour la détection d'IL-10, TNF α , IL-12. Les mesures d'absorbance ont été normalisées par rapport à la quantité de cellules présentes par puits.

5) Test cellulaire de l'antagonisme d'ILT4 avec une lignée cellulaire contenant le gène rapporteur luciférase (Promega)

Le principe de ce test cellulaire mis au point par Promega repose sur le contrôle de l'expression de la luciférase par l'activation du récepteur ILT4 exprimé à la surface d'une lignée cellulaire T effectrice.

Brièvement, une lignée de cellules CHO exprime à sa surface une molécule activatrice du TCR et la molécule HLA-G1 et joue le rôle de CPA (HLA-G⁺ aAPC/CHO). Une autre lignée de cellules Jurkat (cellules T CD4⁺) exprime un TCR, dont l'activation entraîne l'expression de la luciférase, et a été modifiée pour exprimer le récepteur ILT4 à sa surface dont la stimulation entraîne l'inhibition de la voie de signalisation du TCR et donc l'inhibition de l'expression de l'enzyme luciférase. Cette expérience a été réalisée selon les recommandations du protocole du fournisseur Promega.

Dans ce but, les cellules HLA-G⁺ aAPC/CHO adhérentes ont été décongelées, et ensemencées dans des plaques de culture à fond plat blanches (Cell culture microplates, Greiner Bio-one) et incubées dans un incubateur à 37°C sur la nuit. Le lendemain, les cellules effectrices Jurkat-ILT4⁺, non-adhérentes, ont été décongelées et incubées dans les puits contenant les cellules HLA-G⁺ aAPC/CHO, en présence des anticorps anti-ILT4 ou contrôles à différentes concentrations. Après 6h de co-incubation entre ces deux lignées cellulaires, le substrat de la luciférase a été ajouté à chaque puits. L'intensité du signal luminescent, proportionnel à l'activité de la luciférase, a été mesurée (GloMax, Promega). L'augmentation de l'activité de la luciférase par rapport aux puits contrôles sans anticorps fut mesurée par le ratio « valeur de la luminescence du puits test » / « valeur de la luminescence du puits contrôle ». L'anticorps anti-ILT4 de référence utilisé ici est le clone 287219 recommandé par Promega.

IV. Génération d'une lignée de souris transgéniques

1) Processus général

Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec la Plateforme d'Ingénierie des Souris de l'Institut Pasteur, dirigée par la Dr. Francina Langa-Vives et l'entreprise de biologie moléculaire allemande GEN-H.

Le processus pour générer une lignée de souris transgénique par recombinaison homologue, ainsi que la répartition des étapes entre les différents collaborateurs, est résumé ci-dessous :

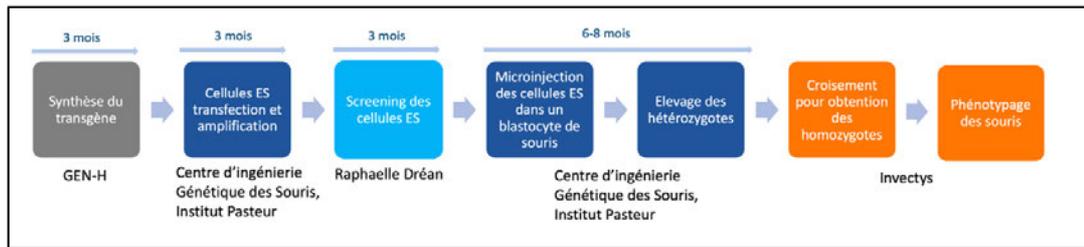


Figure 56 : Processus pour la génération d'une lignée de souris transgéniques ILT4+ PIR-B-

2) Construction du transgène et d'un BAC

Le vecteur plasmidique p915 contenant le transgène, ainsi qu'un chromosome artificiel bactérien (BAC) contenant une séquence du chromosome 7 murin avec le transgène inséré au locus de PIR-B, ont été générés par GEN-H. Le transgène est constitué de l'ADN génomique du locus de l'ILT4 flanqué de deux régions homologues aux sites d'insertion souhaitée sur le locus de PIR-B. La stratégie employée est détaillée dans la partie Résultats, Génération d'une lignée de souris transgéniques.

3) Transfection et amplification des cellules souches embryonnaires (cellules ES)

Cette étape a été réalisée par le Centre d'Ingénierie génétique des souris de l'Institut Pasteur. Brièvement, de 16.10⁶ à 20.10⁶ cellules ES de souris mâles C57BL/6 ont été électroporées avec le plasmide p915 linéarisé. Les cellules ont été clonées par ensemencement en plaques de culture à raison d'une cellule par puits. Les clones résistants ont été sélectionnés à la suite de l'ajout de généticine (G418) dans le milieu de culture. 288 clones résistants ont été sélectionnés et ont d'une part été conservés en plaques 96 puits à -80°C et d'autre part amplifiés en plaque 24 puits. Les clones des plaques 24 puits ont été lysés et conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN.

4) Screening des cellules ES par long range PCR

L'ADN génomique a été extrait à partir des lysats cellulaires par précipitation sur membranes de silice (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel, 740952). Une partie de l'ADN extrait a été dilué à 20 ng/μL en plaque 96 puits pour être analysé par PCR et le restant conservé à -20°C.

Les amorces utilisées pour les PCR de criblage ont été désignées in silico à l'aide du logiciel SnapGene puis synthétisées par Eurofins. Trois enzymes Taq polymérase ont été testées : Taq DNA polymérase (11EPTQL025-CF, MP Biomedicals) Q5 High-Fidelity DNA polymérase (M0491L, NEB) et TaKaRa LA Taq DNA polymérase (RR002B, TaKaRa). Les deux dernières références sont spécialement conçues pour les amplifications de longs fragments d'ADN. L'enzyme TaKaRa LA Taq a finalement été sélectionnée et utilisée pour le criblage par PCR.

Anticorps ou protéine recombinante	Références
ILT4-hFc (human IgG1)	2078-T4, R&D systems
ILT2-Fc (human IgG1)	2017-T2, R&D systems
rANGPTL2	9746-AN/CF, R&D systems
rPIR-B	2754-PB, R&D systems
Anti-PIR-B	AF2754, R&D systems
42D1 (anti-ILT4)	Invitrogen
42D1-PE	Invitrogen
HP-F1 (anti-ILT2)	Invitrogen
HP-F1-PE	Invitrogen
27D6 (anti-ILT4)	Invitrogen
AcM 287219 (anti-ILT4)	R&D Systems
AcM D-6 (anti-ILT)	Santa Cruz
AcM 1D4 (anti-ILT4)	H00010288, Abnova
4H84 HRP (anti-HLA-G domaine α 1)	Santa Cruz
Anti HisTag HRP	Novagen
Anti cMyc HRP, clone 9E10	Abcam
Goat anti-mouse HRP	Invitrogen
Anti-human H+L, cross adsorbed	31412, Invitrogen
Anti-rat HRP	Sigma-Aldrich (AP136P)
Anti MHC class I (clone W6/32)	eBioscience
Anti HLA-G (clone MEM-G/9)	BD Bioscience

Tableau 5 : Liste des anticorps et protéines recombinantes commerciales utilisées

Bibliographie

- Abès, Riad, and Jean Luc Teillaud. 2010. 'Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG'. *Pharmaceuticals* 3(1):146–57.
- Achour, Ikbel, Patricia Cavelier, Magali Tichit, Christiane Bouchier, Pierre Lafaye, and François Rougeon. 2008. 'Tetrameric and Homodimeric Camelid IgGs Originate from the Same IgH Locus'. *The Journal of Immunology* 181(3):2001–9. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2001.
- Ackaert, Chloé, Natalia Smiejkowska, Catarina Xavier, Yann G. J. Sterckx, Sofie Denies, Benoit Stijlemans, Yvon Elkrim, Nick Devoogdt, Vicky Caveliers, Tony Lahoutte, Serge Muyldermans, Karine Breckpot, and Marleen Keyaerts. 2021. 'Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies'. *Frontiers in Immunology* 12(March). doi: 10.3389/fimmu.2021.632687.
- Allan, Rhys S., Jason Waithman, Sammy Bedoui, Claerwen M. Jones, Jose A. Villadangos, Yifan Zhan, Andrew M. Lew, Ken Shortman, William R. Heath, and Francis R. Carbone. 2006. 'Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming'. *Immunity* 25(1):153–62. doi: 10.1016/j.immuni.2006.04.017.
- Amiot, Laurence, Soldano Ferrone, Hans Grosse-Wilde, and Barbara Seliger. 2011. 'Biology of HLA-G in Cancer: A Candidate Molecule for Therapeutic Intervention?' *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(3):417–31.
- Asaadi, Yasaman, Fatemeh Fazlollahi Jouneghani, Sara Janani, and Fatemeh Rahbarizadeh. 2021. 'A Comprehensive Comparison between Camelid Nanobodies and Single Chain Variable Fragments'. *Biomarker Research* 9(1).
- Atwal, Jasvinder K., Julie Pinkston-Gosse, Josh Syken, Scott Stawicki, Yan Wu, Carla Shatz, and Marc Tessier-Lavigne. 2008. 'PirB Is a Functional Receptor for Myelin Inhibitors of Axonal Regeneration'. *Science* 322(5903):967–70. doi: 10.1126/science.1161151.
- Balkwill, Frances R., Melania Capasso, and Thorsten Hagemann. 2012. 'The Tumor Microenvironment at a Glance'. *Journal of Cell Science* 125(23):5591–96. doi: 10.1242/jcs.116392.
- Bannas, Peter, Julia Hambach, and Friedrich Koch-Nolte. 2017. 'Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies as Antitumor Therapeutics'. *Frontiers in Immunology* 8(NOV):1–13. doi: 10.3389/fimmu.2017.01603.
- Bannas, Peter, Alexander Lenz, Valentin Kunick, William Fumey, Björn Rissiek, Joanna Schmid, Friedrich Haag, Axel Leingärtner, Martin Trepel, Gerhard Adam, and Friedrich Koch-Nolte. 2015. 'Validation of Nanobody and Antibody Based in Vivo Tumor Xenograft NIRF-Imaging Experiments in Mice Using Ex Vivo Flow Cytometry and Microscopy'. *Journal of Visualized Experiments* 2015(98). doi: 10.3791/52462.
- Beatty, Gregory L., Elena G. Chiorean, Matthew P. Fishman, Babak Saboury, Ursina R. Teitelbaum, Weijing Sun, Richard D. Huhn, Wenru Song, Dongguang Li, Leslie L. Sharp, Drew A. Torigian, Peter J. O'Dwyer, and Robert H. Vonderheide. 2011. 'CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans'. *Science* 331(6024):1612–16. doi: 10.1126/science.1198443.
- Beck, Alain, Davy Guillarme, Sandrine Fleury-Souverain, Elsa Bodier-Montagutelli, and Renaud Respaud. 2019. 'Biosimilar Monoclonal Antibodies: Comparative Study of Analytical and Functional Quality'. *Medecine/Sciences* 35(12):1146–52.
- Behdani, Mahdi, Sirous Zeinali, Morteza Karimipour, Hossein Khanahmad, Steve Schoonooghe, Azam Aslemarz, Negar Seyed, Reza Moazami-Godarzi, Farzad Baniahmad, Mahdi Habibi-Anbouhi, Gholamreza Hassanzadeh-Ghassabeh, and Serge Muyldermans. 2013.

- 'Development of VEGFR2-Specific Nanobody Pseudomonas Exotoxin A Conjugated to Provide Efficient Inhibition of Tumor Cell Growth'. *New Biotechnology* 30(2):205–9. doi: 10.1016/j.nbt.2012.09.002.
- Bell, Andrea, Zheng J. Wang, Mehdi Arbabi-Ghahroudi, Tingtung A. Chang, Yves Durocher, Ulrike Trojahn, Jason Baardsnes, Maria L. Jaramillo, Shenghua Li, Toya N. Baral, Maureen O'Connor-McCourt, Roger MacKenzie, and Jianbing Zhang. 2010. 'Differential Tumor-Targeting Abilities of Three Single-Domain Antibody Formats'. *Cancer Letters* 289(1):81–90. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.003.
- Bén', Bén, Bénédicte Neven, Emilie Mamessier, Julie Bruneau, Sophie Kaltenbach, Daniel Kotlarz, Felipe Suarez, Julien Masliah-Planchon, Katy Billot, Danielle Canioni, Pierre Frange, Isabelle Radford-Weiss, Vahid Asnafi, Dhaarini Murugan, Christine Bole, Patrick Nitschke, Olivier Goulet, Jean-Laurent Casanova, Stéphane St', Stéphane Blanche, Capucine Picard, Olivier Hermine, Frederic Rieux-Laucat, Nicole Brousse, Frederic Davi, Véronique Baud, Christoph Klein, Bertrand Nadel, Frank Ruemmele, and Alain Fischer. 2013. 'A Mendelian Predisposition to B-Cell Lymphoma Caused by IL-10R Deficiency'. doi: 10.1182/blood-2013-06.
- Bencurova, Elena, Lucia Pulzova, Zuzana Flachbartova, and Mangesh Bhide. 2015. 'A Rapid and Simple Pipeline for Synthesis of mRNA-Ribosome-VHH Complexes Used in Single-Domain Antibody Ribosome Display'. *Molecular BioSystems* 11(6):1515–24. doi: 10.1039/c5mb00026b.
- Benner, Brooke, Luke Scarberry, Lorena P. Suarez-Kelly, Megan C. Duggan, Amanda R. Campbell, Emily Smith, Gabriella Lapurga, Kallie Jiang, Jonathan P. Butchar, Susheela Tridandapani, John Harrison Howard, Robert A. Baiocchi, Thomas A. MacE, and William E. Carson. 2019. 'Generation of Monocyte-Derived Tumor-Associated Macrophages Using Tumor-Conditioned Media Provides a Novel Method to Study Tumor-Associated Macrophages in Vitro'. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7(1). doi: 10.1186/s40425-019-0622-0.
- Benvenuti, Manuela, and Stefano Mangani. 2007. 'Crystallization of Soluble Proteins in Vapor Diffusion for X-Ray Crystallography'. *Nature Protocols* 2(7):1633–51. doi: 10.1038/nprot.2007.198.
- Berg, Daniel J., Natalie Davidson, Ralf Kühn, Werner Müller, Satish Menon, Gina Holland, Luann Thompson-Snipes, Michael W. Leach, and Donna Rennick. 1996. *Enterocolitis and Colon Cancer in Interleukin-10-Deficient Mice Are Associated with Aberrant Cytokine Production and CD4 TH1-like Responses*. Vol. 98.
- Berke, Gideon. 1989. *The Cytolytic T Lymphocyte and Its Mode of Action*. Vol. 20.
- Borges, Luis, and David Cosman. 2000. 'LIRs/ILTs/MIRs, Inhibitory and Stimulatory Ig-Superfamily Receptors Expressed in Myeloid and Lymphoid Cells'. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11(3):209–17. doi: 10.1016/S1359-6101(00)00007-1.
- Borst, Jannie, Julia Busselaar, Douwe M. T. Bosma, and Ferry Ossendorp. 2021. 'Mechanism of Action of PD-1 Receptor/Ligand Targeted Cancer Immunotherapy'. *European Journal of Immunology* 51(8):1911–20.
- Boyson, Jonathan E., Robert Erskine, Mary C. Whitman, Michael Chiu, Julie M. Lau, Louise A. Koopman, Markus M. Valter, Pavia Angelisova, Václav Horejsí, and Jack L. Strominger. 2002. 'Disulfide Bond-Mediated Dimerization of HLA-G on the Cell Surface'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25):16180–85. doi: 10.1073/pnas.212643199.

- Brassart-Pasco, Sylvie, Stéphane Brézillon, Bertrand Brassart, Laurent Ramont, Jean Baptiste Oudart, and Jean Claude Monboisse. 2020. 'Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression'. *Frontiers in Oncology* 10.
- Bronte, Vincenzo, Paolo Serafini, Alessandra Mazzoni, David M. Segal, and Paola Zanovello. 2003. 'L-Arginine Metabolism in Myeloid Cells Controls T-Lymphocyte Functions'. *Trends in Immunology* 24(6):301–5.
- Burt, Richard, Dana Warcel, and Adele K. Fielding. 2019. 'Blinatumomab, a Bispecific B-Cell and T-Cell Engaging Antibody, in the Treatment of B-Cell Malignancies'. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 15(3):594–602. doi: 10.1080/21645515.2018.1540828.
- Cao, Qin, Woo Shik Shin, Henry Chan, Celine K. Vuong, Bethany Dubois, Binsen Li, Kevin A. Murray, Michael R. Sawaya, Juli Feigon, Douglas L. Black, David S. Eisenberg, and Lin Jiang. 2018. 'Inhibiting Amyloid- β Cytotoxicity through Its Interaction with the Cell Surface Receptor LILRB2 by Structure-Based Design'. *Nature Chemistry* 10(12):1213–21. doi: 10.1038/s41557-018-0147-z.
- Carbone, Carmine, Geny Piro, Matteo Fassan, Anna Tamburrino, Maria Mihaela Mina, Marco Zanotto, Paul J. Chiao, Claudio Bassi, Aldo Scarpa, Giampaolo Tortora, and Davide Melisi. 2015. 'An Angiopoietin-like Protein 2 Autocrine Signaling Promotes EMT during Pancreatic Ductal Carcinogenesis'. *Oncotarget* 6(15):13822–34. doi: 10.18632/oncotarget.2635.
- Carbone, Carmine, Geny Piro, Valeria Merz, Francesca Simionato, Raffaella Santoro, Camilla Zecchetto, Giampaolo Tortora, and Davide Melisi. 2018. 'Angiopoietin-like Proteins in Angiogenesis, Inflammation and Cancer'. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2):1–22. doi: 10.3390/ijms19020431.
- Carosella, Edgardo D., Silvia Gregori, and Diana Tronik-Le Roux. 2021. 'HLA-G/LILRBs: A Cancer Immunotherapy Challenge'. *Trends in Cancer* 7(5):389–92. doi: 10.1016/j.trecan.2021.01.004.
- Carosella, Edgardo D., Nathalie Rouas-Freiss, Diana Tronik le Roux, Philippe Moreau, and Joel LeMaoult. 2015. *HLA-G. An Immune Checkpoint Molecule*. Vol. 127. 1st ed. Elsevier Inc.
- Chambers, Cynthia A., Michael S. Kuhns, Jackson G. Egen, and James P. Allison. 2001. *CTLA-4-MEDIATED INHIBITION IN REGULATION OF T CELL RESPONSES: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy*.
- Chames, Patrick, Marc van Regenmortel, Etienne Weiss, and Daniel Baty. 2009. 'Therapeutic Antibodies: Successes, Limitations and Hopes for the Future.' *British Journal of Pharmacology* 157(2):220–33. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x.
- Chames, Patrick, and Thierry Wurch. 2019. 'Bispecific Antibodies, Novel Therapeutic Candidates Harnessing the Immune System'. *Medecine/Sciences* 35(12):1072–82.
- Champiat, Stéphane, Lambros Tselikas, Siham Farhane, Thibault Raoult, Matthieu Texier, Emilie Lanoy, Christophe Massard, Caroline Robert, Samy Ammari, Thierry de Baere, and Aurelien Marabelle. 2021. 'Intratumoral Immunotherapy: From Trial Design to Clinical Practice'. *Clinical Cancer Research* 27(3):665–79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0473.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suciuc-Foca. 2002. 'Tolerization of Dendritic Cells by Ts Cells: The Crucial Role of Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4'. *Nature Immunology* 3(3):237–43. doi: 10.1038/ni760.
- Chanier, Timothée, and Patrick Chames. 2019. 'Nanobody Engineering: Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cancer'. *Antibodies* 8(1):13. doi: 10.3390/antib8010013.

- Chen, Hui Ming, William van der Touw, Yuan Shuo Wang, Kyeongah Kang, Sunny Mai, Jilu Zhang, Dayanira Alsina-Beauchamp, James A. Duty, Sathish Kumar Mungamuri, Bin Zhang, Thomas Moran, Richard Flavell, Stuart Aaronson, Hong Ming Hu, Hisashi Arase, Suresh Ramanathan, Raja Flores, Ping Ying Pan, and Shu Hsia Chen. 2018. 'Blocking Immunoinhibitory Receptor LILRB2 Reprograms Tumor-Associated Myeloid Cells and Promotes Antitumor Immunity'. *Journal of Clinical Investigation* 128(12):5647–62. doi: 10.1172/JCI97570.
- Chen, Mifen, Mengyun Jiang, Xinhui Wang, Lin Shen, and Jian Li. 2022. 'Envafolimab – First PD-1/PD-L1 Antibody to Be Administered by Subcutaneous Injection for Microsatellite Instability-High or Deficient Mismatch Repair Advanced Solid Tumors'. *Expert Opinion on Biological Therapy* 1–6. doi: 10.1080/14712598.2022.2125799.
- Chen, Xiaozheng, Aiqin Gao, Fang Zhang, Zijiang Yang, Shuyun Wang, Yuying Fang, Juan Li, Jingnan Wang, Wenjing Shi, Linlin Wang, Yan Zheng, and Yuping Sun. 2021. 'ILT4 Inhibition Prevents TAM- And Dysfunctional T Cell-Mediated Immunosuppression and Enhances the Efficacy of Anti-PD-L1 Therapy in NSCLC with EGFR Activation'. *Theranostics* 11(7):3392–3416. doi: 10.7150/THNO.52435.
- Cheng, A. L., S. Qin, M. Ikeda, P. Galle, M. Ducreux, A. Zhu, T. Y. Kim, M. Kudo, V. Breder, P. Merle, A. Kaseb, D. Li, W. Verret, Z. Xu, S. Hernandez, J. Liu, C. Huang, S. Mulla, H. Y. Lim, and R. Finn. 2019. 'LBA3 - IMbrave150: Efficacy and Safety Results from a Ph III Study Evaluating Atezolizumab (Atezo) + Bevacizumab (Bev) vs Sorafenib (Sor) as First Treatment (Tx) for Patients (Pts) with Unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC)'. *Annals of Oncology* 30:ix186–87. doi: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz446.002>.
- Cherkassky, Leonid, Aurore Morello, Jonathan Villena-Vargas, Yang Feng, Dimitter S. Dimitrov, David R. Jones, Michel Sadelain, and Prasad S. Adusumilli. 2016. 'Human CAR T Cells with Cell-Intrinsic PD-1 Checkpoint Blockade Resist Tumor-Mediated Inhibition'. *Journal of Clinical Investigation* 126(8):3130–44. doi: 10.1172/JCI83092.
- Chocarro, L., E. Blanco, H. Arasanz, L. Fernández-Rubio, A. Bocanegra, M. Echaide, M. Garnica, P. Ramos, G. Fernández-Hinojal, R. Vera, G. Kochan, and D. Escors. 2022. 'Clinical Landscape of LAG-3-Targeted Therapy'. *Immuno-Oncology and Technology* 14(C):100079. doi: 10.1016/j.iotech.2022.100079.
- Chromikova, Veronika, Alexander Mader, Willibald Steinfeldner, and Renate Kunert. 2015. 'Evaluating the Bottlenecks of Recombinant IgM Production in Mammalian Cells'. *Cytotechnology* 67(2):343–56. doi: 10.1007/s10616-014-9693-4.
- Clements, Craig S., Lars Kjer-Nielsen, Lyudmila Kostenko, Hilary L. Hoare, Michelle A. Dunstone, Eric Moses, Katy Freed, Andrew G. Brooks, Jamie Rossjohn, and James McCluskey. 2005. *Crystal Structure of HLA-G: A Nonclassical MHC Class I Molecule Expressed at the Fetal-Maternal Interface*.
- Cohen, Heather, Yasmin Hashambhoy-Ramsay, Lauren R. Pepper, Jeffrey Y. Smith, Margaret Willer, Kevin Guay, Vikki Spaulding, Kristin O'Malley, Monica Gostissa, Abha Dhaneshwar, Edward C. Stack, Alessandro Mora, and Donald R. Shaffer. 2019. 'Abstract 5007: Preclinical Evaluation of JTX-8064, an Anti-LILRB2 Antagonist Antibody, for Reprogramming Tumor-Associated Macrophages'. 3:5007–5007. doi: 10.1158/1538-7445.sabcs18-5007.
- Colegio, Oscar R., Ngoc Quynh Chu, Alison L. Szabo, Thach Chu, Anne Marie Rhebergen, Vikram Jairam, Nika Cyrus, Carolyn E. Brokowski, Stephanie C. Eisenbarth, Gillian M. Phillips, Gary W. Cline, Andrew J. Phillips, and Ruslan Medzhitov. 2014. 'Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid'. *Nature* 513(7519):559–63. doi: 10.1038/nature13490.

- Colonna, Marco, Hideo Nakajima, and Marina Cella. 2000. 'A Family of Inhibitory and Activating Ig-like Receptors That Modulate Function of Lymphoid and Myeloid Cells'. *MMU NOLOGY* 12:121127. doi: 10.1006rsmim.2000.0214.
- Colonna, Marco, Francisco Navarro, Teresa Bellón, Manuel Llano, Pilar García, Jacqueline Samaridis, Lena Angman, Marina Cella, and Miguel López-Botet. 1997. *A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells*. Vol. 186.
- Comi, Michela, Giada Amodio, and Silvia Gregori. 2018. 'Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells'. *Frontiers in Immunology* 9(APR):1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.00682.
- Dagenais, Gilles R., Darryl P. Leong, Sumathy Rangarajan, Fernando Lanás, Patricio Lopez-Jaramillo, Rajeev Gupta, Rafael Diaz, Alvaro Avezum, Gustavo B. F. Oliveira, Andreas Wielgosz, Shameena R. Parambath, Prem Mony, Khalid F. Alhabib, Ahmet Temizhan, Noorhassim Ismail, Jephath Chifamba, Karen Yeates, Rasha Khatib, Omar Rahman, Katarzyna Zatonska, Khawar Kazmi, Li Wei, Jun Zhu, Annika Rosengren, K. Vijayakumar, Manmeet Kaur, Viswanathan Mohan, Afzal Hussein Yusufali, Roya Kelishadi, Koon K. Teo, Philip Joseph, and Salim Yusuf. 2020. 'Variations in Common Diseases, Hospital Admissions, and Deaths in Middle-Aged Adults in 21 Countries from Five Continents (PURE): A Prospective Cohort Study'. *The Lancet* 395(10226):785–94. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32007-0.
- Daud, Adil I., Jedd D. Wolchok, Caroline Robert, Wen Jen Hwu, Jeffrey S. Weber, Antoni Ribas, F. Stephen Hodi, Anthony M. Joshua, Richard Kefford, Peter Hersey, Richard Joseph, Tara C. Gangadhar, Roxana Dronca, Amita Patnaik, Hassane Zarour, Charlotte Roach, Grant Toland, Jared K. Lunceford, Xiaoyun Nicole Li, Kenneth Emancipator, Marisa Dolled-Filhart, S. Peter Kang, Scot Ebbinghaus, and Omid Hamid. 2016. 'Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma'. *Journal of Clinical Oncology* 34(34):4102–9. doi: 10.1200/JCO.2016.67.2477.
- Debie, Pieterjan, Chrystel Lafont, Michel Defrise, Inge Hansen, Danny M. van Willigen, Fijis W. B. van Leeuwen, Rik Gijssbers, Matthias D'Huyvetter, Nick Devoogdt, Tony Lahoutte, Patrice Mollard, and Sophie Hernot. 2020. 'Size and Affinity Kinetics of Nanobodies Influence Targeting and Penetration of Solid Tumours'. *Journal of Controlled Release* 317(September 2019):34–42. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.11.014.
- DeNardo, David G., and Brian Ruffell. 2019. 'Macrophages as Regulators of Tumour Immunity and Immunotherapy'. *Nature Reviews Immunology* 19(6):369–82.
- Deng, Mi, Zhigang Lu, Junke Zheng, Xuan Wan, Xiaoli Chen, Kouyuki Hirayasu, Hanzi Sun, Yeeling Lam, Liping Chen, Qihui Wang, Chun Song, Niu Huang, George F. Gao, Youxing Jiang, Hisashi Arase, and Cheng Cheng Zhang. 2014. 'A Motif in LILRB2 Critical for Angptl2 Binding and Activation'. *Blood* 124(6):924–35. doi: 10.1182/blood-2014-01-549162.
- Diallo, Béré K., Clémence Riffard, Kenz le Gouge, and Jean Luc Teillaud. 2019. 'MAbs: The History of a Basic Research or the Curiosity as a Source of Wealth'. *Medecine/Sciences* 35(12):926–36. doi: 10.1051/medsci/2019222.
- Ding, Quan Quan, Joe Marc Chauvin, and Hassane M. Zarour. 2020. 'Targeting Novel Inhibitory Receptors in Cancer Immunotherapy'. *Seminars in Immunology* 49(December):101436. doi: 10.1016/j.smim.2020.101436.
- Dong, Bin, Changhua Zhou, Ping He, Jing Li, Siqi Chen, Ji Miao, Qing Li, and Zhong Wang. 2016. 'A Novel Bispecific Antibody, BiSS, with Potent Anti-Cancer Activities'. *Cancer Biology and Therapy* 17(4):364–70. doi: 10.1080/15384047.2016.1139266.

- Dougan, Michael, Jessica R. Ingram, Hee Jin Jeong, Munir M. Mosaheb, Patrick T. Bruck, Lestat Ali, Novalia Pishesha, Olga Blomberg, Paul M. Tyler, Mariah M. Servos, Mohammad Rashidian, Quang de Nguyen, Ulrich H. von Andrian, Hidde L. Ploegh, and Stephanie K. Dougan. 2018. 'Targeting Cytokine Therapy to the Pancreatic Tumor Microenvironment Using PD-L1-Specific VHHs'. *Cancer Immunology Research* 6(4):389–401. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0495.
- Drake, C. G. 2012. 'Combination Immunotherapy Approaches'. in *Annals of Oncology*. Vol. 23.
- Duan, Zhaojun, and Yunping Luo. 2021. 'Targeting Macrophages in Cancer Immunotherapy'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6(1):1–21. doi: 10.1038/s41392-021-00506-6.
- Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2004. 'The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting'. *Immunity* 21(2):137–48. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017.
- Elgueta, Raul, Micah J. Benson, Victor C. de Vries, Anna Wasiuk, Yanxia Guo, and Randolph J. Noelle. 2009. 'Molecular Mechanism and Function of CD40/CD40L Engagement in the Immune System'. *Immunological Reviews* 229(1):152–72. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
- Falzone, Luca, Salvatore Salomone, and Massimo Libra. 2018. 'Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium'. *Frontiers in Pharmacology* 9(NOV).
- Favier, Benoit, Kiave Yune HoWangYin, Juan Wu, Julien Caumartin, Marina Daouya, Anatolij Horuzsko, Edgardo D. Carosella, and Joel le Maoult. 2011. 'Tolerogenic Function of Dimeric Forms of HLA-g Recombinant Proteins: A Comparative Study in Vivo'. *PLoS ONE* 6(7):6–13. doi: 10.1371/journal.pone.0021011.
- Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sauts-Fridman, and Jérôme Galon. 2012. 'The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome'. *Nature Reviews Cancer* 12(4):298–306.
- Fruhirth, Gilbert O., Manfred Kneilling, I. Jolanda M. de Vries, Bettina Weigelin, Mangala Srinivas, and Erik H. J. G. Aarntzen. 2018. 'The Potential of In Vivo Imaging for Optimization of Molecular and Cellular Anti-Cancer Immunotherapies'. *Molecular Imaging and Biology* 20(5):696–704. doi: 10.1007/s11307-018-1254-3.
- Fujimori, Kenji, David G. Covell, John E. Fletcher, and John N. Weinstein. 1989. 'A modeling Analysis of Monoclonal Antibody Percolation through Tumors: A Binding-Site Barrier'. *The Journal of Nuclear Medicine*. 31(7):1192-98.
- Gao, Aiqin, Xia Liu, Wenli Lin, Jingnan Wang, Shuyun Wang, and Fusheng Si. 2021. 'Derived ILT4 Induces T Cell Senescence and Suppresses Tumor Immunity'. doi: 10.1136/jitc-2020-001536.
- Gao, Aiqin, Yuping Sun, and Guangyong Peng. 2018. 'ILT4 Functions as a Potential Checkpoint Molecule for Tumor Immunotherapy'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1869(2):278–85. doi: 10.1016/J.BBCAN.2018.04.001.
- Garber, Ken. 2020. 'Immune Agonist Antibodies Face Critical Test'. *Nature Reviews. Drug Discovery* 19(1):3–5.
- García, Marcela, Maria Belen Palma, Jerome Verine, Santiago Miriuka, Ana M. Inda, Ana L. Errecalde, François Desgrandchamps, Edgardo D. Carosella, and Diana Tronik-le Roux. 2020. 'The Immune-Checkpoint HLA-G / ILT4 Is Involved in the Regulation of VEGF Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma'. 1–11.

- Gardner, Alysia, Álvaro de Mingo Pulido, and Brian Ruffell. 2020. 'Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy'. *Frontiers in Immunology* 11(May):1–14. doi: 10.3389/fimmu.2020.00924.
- Gardner, Alysia, and Brian Ruffell. 2016. 'Dendritic Cells and Cancer Immunity'. *Trends in Immunology* 37(12):855–65.
- Geiger, Roger, Jan C. Rieckmann, Tobias Wolf, Camilla Basso, Yuehan Feng, Tobias Fuhrer, Maria Kogadeeva, Paola Picotti, Felix Meissner, Matthias Mann, Nicola Zamboni, Federica Sallusto, and Antonio Lanzavecchia. 2016. 'L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-Tumor Activity'. *Cell* 167(3):829-842.e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.031.
- Georgoudaki, Anna Maria, Kajska E. Prokopec, Vanessa F. Boura, Eva Hellqvist, Silke Sohn, Jeanette Östling, Rony Dahan, Robert A. Harris, Mattias Rantalainen, Daniel Klevebring, Malin Sund, Suzanne Egyhazi Brage, Jonas Fuxe, Charlotte Rolny, Fubin Li, Jeffrey v. Ravetch, and Mikael C. I. Karlsson. 2016. 'Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis'. *Cell Reports* 15(9):2000–2011. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.084.
- Godakova, Svetlana A., Anatoly N. Noskov, Irina D. Vinogradova, Galina A. Ugriumova, Andrey I. Solovyev, Ilias B. Esmagambetov, Amir I. Tukhvatulin, Denis Y. Logunov, Boris S. Naroditsky, Dmitry v. Shcheblyakov, and Aleksandr L. Gintsburg. 2019. 'Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection against Botulinum Neurotoxin a in Mice'. *Toxins* 11(8). doi: 10.3390/toxins11080464.
- Goldman-Wohl, D. S., I. Ariel, C. Greenfield, D. Hochner-Celnikier, J. Cross, S. Fisher, and S. Yagel. 2000. *Lack of Human Leukocyte Antigen-G Expression in Extravillous Trophoblasts Is Associated with Pre-Eclampsia*. Vol. 6.
- Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, and Zena Werb. 2018. 'Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression'. *Genes and Development* 32(19–20):1267–84. doi: 10.1101/GAD.314617.118.
- Gransagne, Marion, Gabriel Aymé, Sébastien Brier, Gâelle Chauveau-Le Friec, Véronique Meriaux, Mireille Nowakowski, François Dejardin, Sylvain Levallois, Guilherme Dias de Melo, Flora Donati, Matthieu Prot, Sébastien Brûlé, Bertrand Raynal, Jacques Bellalou, Pedro Goncalves, Xavier Montagutelli, James P. di Santo, Françoise Lazarini, Patrick England, Stéphane Petres, Nicolas Escriou, and Pierre Lafaye. 2022. 'Development of a Highly Specific and Sensitive VHH-Based Sandwich Immunoassay for the Detection of the SARS-CoV-2 Nucleoprotein'. *Journal of Biological Chemistry* 298(1). doi: 10.1016/j.jbc.2021.101290.
- Gregori, Silvia, Daniela Tomasoni, Valentina Pacciani, Miriam Scirpoli, Manuela Battaglia, Chiara Francesca Magnani, Ehud Hauben, and Maria Grazia Roncarolo. 2010. 'Differentiation of Type 1 T Regulatory Cells (Tr1) by Tolerogenic DC-10 Requires the IL-10-Dependent ILT4/HLA-G Pathway'. *Blood* 116(6):935–44. doi: 10.1182/blood-2009-07-234872.
- Griffiths, Katherine, Uli Binder, William McDowell, Rita Tommasi, Mark Frigerio, William G. Darby, Chris G. Hosking, Lionel Renaud, Matthias Machacek, Peter Lloyd, Arne Skerra, and Michael Foley. 2019. 'Half-Life Extension and Non-Human Primate Pharmacokinetic Safety Studies of i-Body AD-114 Targeting Human CXCR4'. *MAbs* 11(7):1331–40. doi: 10.1080/19420862.2019.1626652.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten, and Michael Karin. 2010. 'Immunity, Inflammation, and Cancer'. *Cell* 140(6):883–99.

- Groot, Arjan J., Eelke H. Gort, Elsken van der Wall, Paul J. van Diest, and Marc Vooijs. 2008. 'Conditional Inactivation of HIF-1 Using Intrabodies'. *Cellular Oncology* 30(5):397–409. doi: 10.3233/CLO-2008-0442.
- Gros, Frédéric, Florian Cabillic, Olivier Tourirais, Amélie le Maux, Yasmine Sebti, and Laurence Amiot. 2008. 'Soluble HLA-G Molecules Impair Natural Killer/Dendritic Cell Crosstalk via Inhibition of Dendritic Cells'. *European Journal of Immunology* 38(3):742–49. doi: 10.1002/eji.200736918.
- Gross, G., G. Gorochoy, T. Waks, and Z. Eshhar. 1989. 'Generation of Effector T Cells Expressing Chimeric T Cell Receptor with Antibody Type-Specificity'. *Transplantation Proceedings* 21(1 Pt 1):127–130.
- Grosser, Rachel, Leonid Cherkassky, Navin Chintala, and Prasad S. Adusumilli. 2019. 'Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors'. *Cancer Cell* 36(5):471–82.
- Guerra-De Blas, Paola Del Carmen, Yael Sebastián Villaseñor-Talavera, Daniela De Jesús Cruz-González, Lourdes Baranda, Lesly Doníz-Padilla, Carlos Abud-Mendoza, Roberto González-Amaro, and Adriana Elizabeth Monsiváis-Urenda. 2016. 'Analysis of the Expression and Function of Immunoglobulin-Like Transcript 4 (ILT4, LILRB2) in Dendritic Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus'. *Journal of Immunology Research* 2016. doi: 10.1155/2016/4163094.
- Gutierrez, Martin, Anna Spreafico, Ding Wang, Talia Golan, Daniel Renouf, Mark Voskoboynik, Manash Shanker Chatterjee, Kishan J. Kapadia, Qi Liu, Gopala Kovvali, Leah Suttner, Ling Pang, Mei Chen and Anthony W. Tolcher. 2022. 'Phase 1 first-in-human study of anti-ILT3 mAb MK-0482 as monotherapy and in combination with pembrolizumab in advanced solid tumors: Dose escalation results.' *J Clin Oncol* 40, 2022 (suppl 16; abstr 2505). Clinical Trial Registration Number: NCT03918278.
- HamersCasterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. Bajyana Songa, N. Bendahman, and R. Hamerst. 1993. *Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains*.
- Hanahan, Douglas. 2022. 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions'. *Cancer Discovery* 12(1):31–46.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. *The Hallmarks of Cancer Review Evolve Progressively from Normalcy via a Series of Pre*. Vol. 100.
- Hangiu, Oana, Marta Compte, Anders Dinesen, Rocio Navarro, Antonio Tapia-Galisteo, Ole A. Mandrup, Ainhoa Erce-Llamazares, Rodrigo Lázaro-Gorines, Daniel Nehme-Álvarez, Carmen Domínguez-Alonso, Seandean L. Harwood, Carlos Alfonso, Belen Blanco, Laura Rubio-Pérez, Anaïs Jiménez-Reinoso, Laura Díez-Alonso, Francisco J. Blanco, Laura Sanz, Kenneth A. Howard, and Luis Álvarez-Vallina. 2022. 'Tumor Targeted 4-1BB Agonist Antibody-Albumin Fusions with High Affinity to FcRn Induce Anti-Tumor Immunity without Toxicity'. *iScience* 25(9). doi: 10.1016/j.isci.2022.104958.
- Hart, Kevin M., Katelyn T. Byrne, Michael J. Molloy, Edward M. Usherwood, and Brent Berwin. 2011. 'IL-10 Immunomodulation of Myeloid Cells Regulates a Murine Model of Ovarian Cancer'. *Frontiers in Immunology* 2(JUL). doi: 10.3389/fimmu.2011.00029.
- Hashambhoy-ramsay, Yasmin, Vikki Spaulding, Michelle Priess, Kristin O. Malley, Monica Gostissa, Edward C. Stack, Heather Cohen, Jeffrey Y. Smith, Kristen Legendre, Andrew Dunn, Lara Mcgrath, Margaret Willer, Ben Umiker, and Donald R. Shaffer. n.d. 'Evaluating Biomarkers of JTX-8064 (Anti-LILRB2 / ILT4 Monoclonal Antibody) in an Ex Vivo Human Tumor Histoculture System to Inform Clinical Development'. 8064:8064.

- Haslam, Alyson, and Vinay Prasad. 2019. 'Estimation of the Percentage of Us Patients with Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs'. *JAMA Network Open* 2(5).
- He, Jian, Jie Xu, Xiaoting Yu, Hailong Zhu, Yu Zeng, Desheng Fan, and Xianghua Yi. 2018. 'Overexpression of ANGPTL2 and LILRB2 as Predictive and Therapeutic Biomarkers for Metastasis and Prognosis in Colorectal Cancer'. *Int J Clin Exp Pathol* 11(5):2281–94.
- He, Xing, and Chenqi Xu. 2020. 'Immune Checkpoint Signaling and Cancer Immunotherapy'. *Cell Research* 30(8):660–69.
- Heldin, Cari-Henrik. 1995. *Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction Review*. Vol. 80.
- Hettich, Michael, Friederike Braun, Mark D. Bartholomä, Reinhold Schirmbeck, and Gabriele Niedermann. 2016. 'High-Resolution PET Imaging with Therapeutic Antibody-Based PD-1/PD-L1 Checkpoint Tracers'. *Theranostics* 6(10):1629–40. doi: 10.7150/thno.15253.
- Hoefman, Sven, Ingrid Ottevaere, Judith Baumeister, and Maria Laura Sargentini-maier. 2015. 'Pre-Clinical Intravenous Serum Pharmacokinetics of Albumin Binding and Non-Half-Life Extended Nanobodies®'. 141–56. doi: 10.3390/antib4030141.
- Homayouni, Vida, Mazdak Ganjalikhani-Hakemi, Abbas Rezaei, Hossein Khanahmad, Mahdi Behdani, and Fatemeh Kazemi Lomedasht. 2016. *Preparation and Characterization of a Novel Nanobody against T-Cell Immunoglobulin and Mucin-3 (TIM-3)*. Vol. 19.
- Hoogenboezem, Ella N., and Craig L. Duvall. 2018. 'Harnessing Albumin as a Carrier for Cancer Therapies'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 130:73–89. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
- Horiguchi, Haruki, Tsuyoshi Kadomatsu, Ryoma Kurahashi, Chiaki Hara, Keishi Miyata, Masaya Baba, Hironobu Osumi, Kazutoyo Terada, Kimi Araki, Toshiyuki Takai, Tomomi Kamba, W. Marston Linehan, Toshiro Moroishi, and Yuichi Oike. 2019. 'Dual Functions of Angiopoietin-like Protein 2 Signaling in Tumor Progression and Anti-Tumor Immunity'. doi: 10.1101/gad.329417.
- Horita, Shoichiro, Yayoi Nomura, Yumi Sato, Tatsuro Shimamura, So Iwata, and Norimichi Nomura. 2016. 'High-Resolution Crystal Structure of the Therapeutic Antibody Pembrolizumab Bound to the Human PD-1'. *Scientific Reports* 6(October):1–8. doi: 10.1038/srep35297.
- HoWangYin, Kiave Yune, Maria Loustau, Juan Wu, Estibaliz Alegre, Marina Daouya, Julien Caumartin, Sylvie Sousa, Anatolij Horuzsko, Edgardo D. Carosella, and Joel LeMaout. 2012. 'Multimeric Structures of HLA-G Isoforms Function through Differential Binding to LILRB Receptors'. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(23):4041–49. doi: 10.1007/s00018-012-1069-3.
- Huang, Yuhui, Jianping Yuan, Elda Righi, Walid S. Kamoun, Marek Ancukiewicz, Jean Nezivar, Michael Santosuosso, John D. Martin, Margaret R. Martin, Fabrizio Vianello, Pierre Leblanc, Lance L. Munn, Peigen Huang, Dan G. Duda, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, and Mark C. Poznansky. 2012. 'Vascular Normalizing Doses of Antiangiogenic Treatment Reprogram the Immunosuppressive Tumor Microenvironment and Enhance Immunotherapy'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(43):17561–66. doi: 10.1073/pnas.1215397109.
- Itano, Andrea A., Stephen J. McSorley, R. Lee Reinhardt, Benjamin D. Ehst, Elizabeth Ingulli, Alexander Y. Rudensky, and Marc K. Jenkins. 2003. 'Distinct Dendritic Cell Populations Sequentially Present Antigen to CD4 T Cells and Stimulate Different Aspects of Cell-Mediated Immunity'. *Immunity* 19:47-57.

- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12293-7. doi: 10.1073/pnas.192461099. Epub 2002 Sep 6. PMID: 12218188; PMCID: PMC129438.
- Iwanowycz, Stephen, Soo Ngoi, Yingqi Li, Megan Hill, Christopher Koivisto, Melodie Parrish, Beichu Guo, Zihai Li, and Bei Liu. 2021. 'Type 2 Dendritic Cells Mediate Control of Cytotoxic T Cell Resistant Tumors'. *JCI Insight* 6(17):1–17. doi: 10.1172/jci.insight.145885.
- Jiang, Zhongxing, Hao Sun, Jifeng Yu, Wenzhi Tian, and Yongping Song. 2021. 'Targeting CD47 for Cancer Immunotherapy'. *Journal of Hematology and Oncology* 14(1).
- Joubert, Simon, Vincent Dodelet, Roland Béliard, and Yves Durocher. 2019. 'La Bioproduction Des Anticorps Monoclonaux'. *Medecine Sciences : M/S* 35(12):1153–59.
- Jovčevska, Ivana, and Serge Muyltermans. 2020. 'The Therapeutic Potential of Nanobodies'. *BioDrugs* 34(1):11–26. doi: 10.1007/s40259-019-00392-z.
- Kadomatsu, Tsuyoshi, Motoyoshi Endo, Keishi Miyata, and Yuichi Oike. 2014. 'Diverse Roles of ANGPTL2 in Physiology and Pathophysiology'. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25(5):245–54. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.012.
- Kang, Xunlei, Jaehyup Kim, Mi Deng, Samuel John, Heyu Chen, Guojin Wu, Hiep Phan, and Cheng Cheng Zhang. 2016. 'Inhibitory Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors: Immune Checkpoint Proteins and Tumor Sustaining Factors'. *Cell Cycle* 15(1):25–40. doi: 10.1080/15384101.2015.1121324.
- Keller, Bettina Maria, Julia Maier, Kathy Ann Secker, Stefanie Maria Egetemaier, Yana Parfyonova, Ulrich Rothbauer, and Bjoern Traenkle. 2018. 'Chromobodies to Quantify Changes of Endogenous Protein Concentration in Living Cells'. *Molecular and Cellular Proteomics* 17(12):2518–33. doi: 10.1074/mcp.TIR118.000914.
- Kijanka, Marta, Bram Dorresteijn, Sabrina Oliveira, and Paul M. P. van Bergen En Henegouwen. 2015. 'Nanobody-Based Cancer Therapy of Solid Tumors'. *Nanomedicine* 10(1):161–74. doi: 10.2217/nnm.14.178.
- Kim, Jonghan, William L. Hayton, John M. Robinson, and Clark L. Anderson. 2007. 'Kinetics of FcRn-Mediated Recycling of IgG and Albumin in Human: Pathophysiology and Therapeutic Implications Using a Simplified Mechanism-Based Model'. *Clinical Immunology* 122(2):146–55. doi: 10.1016/j.clim.2006.09.001.
- Kim, Taeho, George S. Vidal, Maja Djuricic, Christopher M. William, Michael E. Birnbaum, K. Christopher Garcia, Bradley T. Hyman, and Carla J. Shatz. 2013. 'Human LILRB2 Is a β -Amyloid Receptor and Its Murine Homolog PirB Regulates Synaptic Plasticity in an Alzheimer's Model'. *Science* 341(6152):1399–1404. doi: 10.1126/science.1242077.
- Kitten, Olivier, and Pierre Martineau. 2019. 'Les Formats Alternatifs Aux Anticorps - Fragments et Nouvelles Charpentés'. *Medecine Sciences : M/S* 35(12):1092–97. doi: 10.1051/medsci/2019217.
- Köstlin, Natascha, Anna Lena Ostermeir, Bärbel Spring, Julian Schwarz, Alexander Marmé, Christina B. Walter, Christian F. Poets, and Christian Gille. 2017. 'HLA-G Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Suppressive Activity during Human Pregnancy through Engagement of the Receptor ILT4'. *European Journal of Immunology* 47(2):374–84. doi: 10.1002/eji.201646564.
- Kovats, Susan, Elliott K. Main, Clifford Librach, Marica Stubblebine, Susan J. Fisher, Robert DeMars. 1990. 'A Class I Antigen, HLA-G, Expressed in Human Trophoblasts'. *Science*. 248:220-223.

- Kretschmer, Anna, Ralf Schwanbeck, Thomas Valerius, and Thies Rösner. 2017. 'Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy'. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 44(5):320–26. doi: 10.1159/000479240.
- Kuang, Dong Ming, Qiyi Zhao, Chen Peng, Jing Xu, Jing Ping Zhang, Changyou Wu, and Limin Zheng. 2009. 'Activated Monocytes in Peritumoral Stroma of Hepatocellular Carcinoma Foster Immune Privilege and Disease Progression through PD-L1'. *Journal of Experimental Medicine* 206(6):1327–37. doi: 10.1084/jem.20082173.
- Kuroki, Kimiko, Atsushi Furukawa, and Katsumi Maenaka. 2012. 'Molecular Recognition of Paired Receptors in the Immune System'. *Frontiers in Microbiology* 3(DEC):1–12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00429.
- Kuroki, Kimiko, Haruki Matsubara, Ryo Kanda, Naoyuki Miyashita, Mitsunori Shiroishi, Yuko Fukunaga, Jun Kamishikiryo, Atsushi Fukunaga, Hideo Fukuhara, Kaoru Hirose, Joan S. Hunt, Yuji Sugita, Shunsuke Kita, Toyoyuki Ose, and Katsumi Maenaka. 2019. 'Structural and Functional Basis for LILRB Immune Checkpoint Receptor Recognition of HLA-G Isoforms'. *The Journal of Immunology* 203(12):3386–94. doi: 10.4049/jimmunol.1900562.
- Kusmartsev, Sergei, Srinivas Nagaraj, Dmitry I. Gabrilovich, and H. Lee. n.d. *Tumor Associated CD8 + T-Cell Tolerance Induced by Bone Marrow Derived Immature Myeloid Cells 1*.
- Kusmartsev, Sergei, Yulia Nefedova, Daniel Yoder, and Dmitry I. Gabrilovich. 2004. 'Antigen-Specific Inhibition of CD8 + T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species'. *The Journal of Immunology* 172(2):989–99. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.989.
- Lafaye, Pierre, Dominique Lesuisse, and Xavier Declèves. 2019. 'Améliorer Le Ciblage Tissulaire Des Anticorps Thérapeutiques Par de Nouveaux Formats - L'exemple de La Barrière Hémato-Encéphalique'. *Medecine Sciences: M/S* 35(12):1106–12. doi: 10.1051/medsci/2019223.
- Lafaye, Pierre, and Tengfei Li. 2018. 'Use of Camel Single-Domain Antibodies for the Diagnosis and Treatment of Zoonotic Diseases'. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 60(December 2017):17–22. doi: 10.1016/j.cimid.2018.09.009.
- Lane, Ryan S., Julia Femel, Alec P. Breazeale, Christopher P. Loo, Guillaume Thibault, Andy Kaempf, Motomi Mori, Takahiro Tsujikawa, Young Hwan Chang, and Amanda W. Lund. 2018. 'IFN γ -Activated Dermal Lymphatic Vessels Inhibit Cytotoxic T Cells in Melanoma and Inflamed Skin'. *Journal of Experimental Medicine* 215(12):3057–74. doi: 10.1084/jem.20180654.
- Larsen, Annette K., Djamila Ouaret, Karima el Ouadrani, and Amélie Petitprez. 2011. 'Targeting EGFR and VEGF(R) Pathway Cross-Talk in Tumor Survival and Angiogenesis'. *Pharmacology and Therapeutics* 131(1):80–90.
- Lee, Carol M. Y., Niccolo Iorno, Frederic Sierro, and Daniel Christ. 2007. 'Selection of Human Antibody Fragments by Phage Display'. *Nature Protocols* 2(11):3001–8. doi: 10.1038/nprot.2007.448.
- Lee, Hyun Tae, Ju Yeon Lee, Heejin Lim, Sang Hyung Lee, Yu Jeong Moon, Hyo Jeong Pyo, Seong Eon Ryu, Woori Shin, and Yong Seok Heo. 2017. 'Molecular Mechanism of PD-1/PD-L1 Blockade via Anti-PD-L1 Antibodies Atezolizumab and Durvalumab'. *Scientific Reports* 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-06002-8.
- Lee, Ju Yeon, Hyun Tae Lee, Woori Shin, Jongseok Chae, Jaemo Choi, Sung Hyun Kim, Heejin Lim, Tae Won Heo, Kyeong Young Park, Yeon Ji Lee, Seong Eon Ryu, Ji Young Son, Jee Un Lee, and Yong Seok Heo. 2016. 'Structural Basis of Checkpoint Blockade by Monoclonal

- Antibodies in Cancer Immunotherapy'. *Nature Communications* 7. doi: 10.1038/ncomms13354.
- Lee, Sang Hyung, Hyun Tae Lee, Heejin Lim, Yujin Kim, Ui Beom Park, and Yong Seok Heo. 2020. 'Crystal Structure of PD-1 in Complex with an Antibody-Drug Tislelizumab Used in Tumor Immune Checkpoint Therapy'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 527(1):226–31. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.04.121.
- Lee, Won Suk, Hannah Yang, Hong Jae Chon, and Chan Kim. 2020. 'Combination of Anti-Angiogenic Therapy and Immune Checkpoint Blockade Normalizes Vascular-Immune Crosstalk to Potentiate Cancer Immunity'. *Experimental and Molecular Medicine* 52(9):1475–85.
- LeMaoult, Joël, Kamélia Zafaranloo, Caroline le Banff, and Edgardo D. Carosella. 2005. 'HLA-G up-Regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in Antigen Presenting Cells, NK Cells, and T Cells'. *FASEB Journal* 19(6):662–64. doi: 10.1096/fj.04-1617fje.
- Lewis, Claire E., and Jeffrey W. Pollard. 2006. 'Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments'. *Cancer Research* 66(2):605–12.
- Li, Qing, Juan Li, Shuyun Wang, Jingnan Wang, Xiaozheng Chen, Dongmei Zhou, Yuying Fang, Aiqin Gao, and Yuping Sun. 2020. 'Overexpressed Immunoglobulin-like Transcript (ILT) 4 in Lung Adenocarcinoma Is Correlated with Immunosuppressive T Cell Subset Infiltration and Poor Patient Outcomes'. *Biomarker Research* 8(1):1–11. doi: 10.1186/s40364-020-00191-7.
- Li, Tengfei, Jean Pierre Bourgeois, Susanna Celli, Fabienne Glacial, Anne Marie le Sourd, Salah Mecheri, Babette Weksler, Ignacio Romero, Pierre Olivier Couraud, François Rougeon, and Pierre Lafaye. 2012. 'Cell-Penetrating Anti-GFAP VHH and Corresponding Fluorescent Fusion Protein VHH-GFP Spontaneously Cross the Blood-Brain Barrier and Specifically Recognize Astrocytes: Application to Brain Imaging'. *FASEB Journal* 26(10):3969–79. doi: 10.1096/fj.11-201384.
- Li, Tengfei, Matthias Vandesquille, Fani Koukouli, Clémence Duffeffant, Ihsen Youssef, Pascal Lenormand, Christelle Ganneau, Uwe Maskos, Christian Czech, Fiona Grueninger, Charles Duyckaerts, Marc Dhenain, Sylvie Bay, Benoît Delatour, and Pierre Lafaye. 2016. 'Camelid Single-Domain Antibodies: A Versatile Tool for in Vivo Imaging of Extracellular and Intracellular Brain Targets'. *Journal of Controlled Release* 243:1–10. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.019.
- Li, Tianhang, Tianyao Liu, Wenjie Zhu, Shangxun Xie, Zihan Zhao, Baofu Feng, Hongqian Guo, and Rong Yang. 2021. 'Targeting MDSC for Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy: Current Progress and New Prospects'. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 15.
- Liang, Siyuan, Boris Baibakov, and Anatolij Horuzsko. 2002. 'HLA-G Inhibits the Functions of Murine Dendritic Cells via the PIR-B Immune Inhibitory Receptor'. *European Journal of Immunology* 32(9):2418–26. doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2418::AID-IMMU2418>3.0.CO;2-L.
- Lin, Aifen, and Wei Hua Yan. 2015. 'Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cancers: Roles in Immune Evasion, Metastasis and Target for Therapy'. *Molecular Medicine* 21:782–91. doi: 10.2119/molmed.2015.00083.
- Linch, Stefanie N., Michael J. McNamara, and William L. Redmond. 2015. 'OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal'. *Frontiers in Oncology* 5(FEB).

- Liu, Jin-feng, Juan Li, Peng Yan, Wen-jing Gong, and Yu-ping Sun. 2019. 'Silencing of ILT4 Suppresses Migration and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting MMP-2'. *12(5):5306–14*.
- Liu, Xiaoye, Xiaoting Yu, Jingjing Xie, Mengna Zhan, Zhuo Yu, Li Xie, Hongxiang Zeng, Feifei Zhang, Guoqiang Chen, Xianghua Yi, and Junke Zheng. 2015. 'ANGPTL2/LILRB2 Signaling Promotes the Propagation of Lung Cancer Cells'. *Oncotarget* 6(25):21004–15. doi: 10.18632/oncotarget.4217.
- Loumagne, Laure, Jeremy Baudhuin, Benoit Favier, Florent Montespan, Edgardo D. Carosella, and Nathalie Rouas-Freiss. 2014. 'In Vivo Evidence That Secretion of HLA-G by Immunogenic Tumor Cells Allows Their Evasion from Immunosurveillance'. *International Journal of Cancer* 135(9):2107–17. doi: 10.1002/ijc.28845.
- Loustau, Maria, François Anna, Raphaëlle Dréan, Martin Lecomte, Pierre Langlade-Demoyen, and Julien Caumartin. 2020. 'HLA-G Neo-Expression on Tumors'. *Frontiers in Immunology* 11(August):1685. doi: 10.3389/fimmu.2020.01685.
- Lu, Rwei Min, Yu Chyi Hwang, I. Ju Liu, Chi Chiu Lee, Han Zen Tsai, Hsin Jung Li, and Han Chung Wu. 2020. 'Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases'. *Journal of Biomedical Science* 27(1).
- Ma, Ge, Ping Ying Pan, Samuel Eisenstein, Celia M. Divino, Clifford A. Lowell, Toshiyuki Takai, and Shu Hsia Chen. 2011. 'Paired Immunoglobulin-like Receptor-B Regulates the Suppressive Function and Fate of Myeloid-Derived Suppressor Cells'. *Immunity* 34(3):385–95. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.004.
- Mabuchi, Seiji, Tomoyuki Sasano, and Naoko Komura. 2021. 'Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Ovarian Cancer'. *Cells* 10(2):1–12.
- Manavalan, John S., Paola C. Rossi, George Vlad, Flavia Piazza, Anna Yarilina, Raffaello Cortesini, Donna Mancini, and Nicole Suci-Foca. 2003. 'High Expression of ILT3 and ILT4 Is a General Feature of Tolerogenic Dendritic Cells'. *Transplant Immunology* 11(3–4):245–58. doi: 10.1016/S0966-3274(03)00058-3.
- Manon, Dubois, Ardin Camille, André Fanny, Scherpereel Arnaud, and Mortier Laurent. 2019. 'REVUES L' Immunothérapie , Une Révolution En Oncologie'.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Federica Marchesi, and Cecilia Garlanda. 2022. 'Macrophages as Tools and Targets in Cancer Therapy'. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Marin-Acevedo, Julian A., Bhagirathbhai Dholaria, Aixa E. Soyano, Keith L. Knutson, Saranya Chumsri, and Yanyan Lou. 2018. 'Next Generation of Immune Checkpoint Therapy in Cancer: New Developments and Challenges'. *Journal of Hematology and Oncology* 11(1).
- Marin-Acevedo, Julian A., Erin Marie O. Kimbrough, and Yanyan Lou. 2021. 'Next Generation of Immune Checkpoint Inhibitors and Beyond'. *Journal of Hematology and Oncology* 14(1):1–29. doi: 10.1186/s13045-021-01056-8.
- Masuda, Ai, Akira Nakamura, Tsutomu Maeda, Yuzuru Sakamoto, and Toshiyuki Takai. 2007. 'Cis Binding between Inhibitory Receptors and MHC Class I Can Regulate Mast Cell Activation'. *Journal of Experimental Medicine* 204(4):907–20. doi: 10.1084/jem.20060631.
- Mayes, Patrick A., Kenneth W. Hance, and Axel Hoos. 2018. 'The Promise and Challenges of Immune Agonist Antibody Development in Cancer'. *Nature Reviews Drug Discovery* 17(7):509–27. doi: 10.1038/nrd.2018.75.
- McIntire, Ramsey H., Pedro J. Morales, Margaret G. Petroff, Marco Colonna, and Joan S. Hunt. 2004. 'Recombinant HLA-G5 and -G6 Drive U937 Myelomonocytic Cell Production of TGF-B1'. *Journal of Leukocyte Biology* 76(6):1220–28. doi: 10.1189/jlb.0604337.

- Merlot, Angelica M., Danuta S. Kalinowski, and Des R. Richardson. 2014. 'Unraveling the Mysteries of Serum Albumin-More than Just a Serum Protein'. *Frontiers in Physiology* 5 AUG(August):1–7. doi: 10.3389/fphys.2014.00299.
- Minchinton, Andrew I., and Ian F. Tannock. 2006. 'Drug Penetration in Solid Tumours'. *Nature Reviews Cancer* 6(8):583–92.
- Moeglin, Eric, Dominique Desplancq, Audrey Stoessel, Christian Massute, Jeremy Ranniger, Alastair G. McEwen, Gabrielle Zeder-Lutz, Mustapha Oulad-Abdelghani, Manuela Chiper, Pierre Lafaye, Barbara di Ventura, Pascal Didier, Arnaud Poterszman, and Etienne Weiss. 2021. 'A Novel Nanobody Precisely Visualizes Phosphorylated Histone H2AX in Living Cancer Cells under Drug-Induced Replication Stress'. *Cancers* 13(13). doi: 10.3390/cancers13133317.
- Mondal, Kalyani, Christina Song, Jane Tian, Carmence Ho, Lee B. Rivera, Jiawei Huang, Peirong Chen, Suzanne Crawley, Vicky Y. Lin, Jonathan Sitrin, Julie M. Roda, David Shen, Hui Tian, Yan Wang, Alan Kutach, Jeong Kim, James Sissons, Daniel D. Kaplan, and Geoffrey W. Stone. 2021. 'Abstract LB156: Preclinical Evaluation of NGM707, a Novel Anti-ILT2/Anti-ILT4 Dual Antagonist Monoclonal Antibody'. *Cancer Research* 81(13_Supplement):LB156–LB156. doi: 10.1158/1538-7445.AM2021-LB156.
- Monnier, Philippe P., Robin J. Vigouroux, and Nardos G. Tassew. 2013. 'In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (ScFv) Fragments'. *Antibodies* 2(2):193–208.
- Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976 Aug;116(2):180-3. doi: 10.1016/s0022-5347(17)58737-6. PMID: 820877.
- Mori, Yu, Sukenao Tsuji, Masanori Inui, Yuzuru Sakamoto, Shota Endo, Yumi Ito, Shion Fujimura, Takako Koga, Akira Nakamura, Hiroshi Takayanagi, Eiji Itoi, and Toshiyuki Takai. 2008. 'Inhibitory Immunoglobulin-Like Receptors LILRB and PIR-B Negatively Regulate Osteoclast Development'. *The Journal of Immunology* 181(7):4742–51. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4742.
- Müller-Quernheim, Ulrike Carolin, Lars Potthast, Joachim Müller-Quernheim, and Gernot Zissel. 2012. 'Tumor-Cell Co-Culture Induced Alternative Activation of Macrophages Is Modulated by Interferons in Vitro'. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 32(4):169–77. doi: 10.1089/jir.2011.0020.
- Munari, Enrico, Francesca R. Mariotti, Linda Quatrini, Pietro Bertoglio, Nicola Tumino, Paola Vacca, Albino Eccher, Francesco Ciompi, Matteo Brunelli, Guido Martignoni, Giuseppe Bogina, and Lorenzo Moretta. 2021. 'PD-1/Pd-L1 in Cancer: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Aspects'. *International Journal of Molecular Sciences* 22(10).
- de Munter, Stijn, Joline Ingels, Glenn Goetgeluk, Sarah Bonte, Melissa Pille, Karin Weening, Tessa Kerre, Hinrich Abken, and Bart Vandekerckhove. 2018. 'Nanobody Based Dual Specific CARs'. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2). doi: 10.3390/ijms19020403.
- Muyldermans, Serge. 2013. 'Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies'. *Annual Review of Biochemistry* 82:775–97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- Muyldermans, Serge. 2021a. 'A Guide to: Generation and Design of Nanobodies'. *FEBS Journal* 288(7):2084–2102.
- Muyldermans, Serge. 2021b. 'Applications of Nanobodies'. *Annual Review of Animal Biosciences* 9(1):1–21. doi: 10.1146/annurev-animal-021419-083831.

- Na, Zhenkun, Siok Ping Yeo, Sakshibeedu R. Bharath, Matthew W. Bowler, Esra Balikçi, Cheng I. Wang, and Haiwei Song. 2017. 'Structural Basis for Blocking PD-1-Mediated Immune Suppression by Therapeutic Antibody Pembrolizumab'. *Cell Research* 27(1):147–50.
- Nakajima, Hideo, Azusa Asai, Aki Okada, Lin Ping, Fumiyasu Hamajima, Tetsutaro Sata, and Kenichi Isobe. 2003. 'Transcriptional Regulation of ILT Family Receptors'. *The Journal of Immunology* 171(12):6611–20. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6611.
- Nishida, Naoyo, Hirohisa Yano, Takashi Nishida, Toshiharu Kamura, Masamichi Kojiro. 2006. 'Angiogenesis in cancer'. *Vascular Health and Risk Management*. 2(3):213–219.
- Noy, Roy, and Jeffrey W. Pollard. 2014. 'Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy'. *Immunity* 41(1):49–61.
- Nuñez-Prado, Natalia, Marta Compte, Seandean Harwood, Ana Álvarez-Méndez, Simon Lykkemark, Laura Sanz, and Luis Álvarez-Vallina. 2015. 'The Coming of Age of Engineered Multivalent Antibodies'. *Drug Discovery Today* 20(5):588–94. doi: 10.1016/j.drudis.2015.02.013.
- Odagiri, Haruki, Tsuyoshi Kadomatsu, Motoyoshi Endo, Tetsuro Masuda, Masaki Suimye Morioka, Shigetomo Fukuhara, Takeshi Miyamoto, Eisuke Kobayashi, Keishi Miyata, Jun Aoi, Haruki Horiguchi, Naotaka Nishimura, Kazutoyo Terada, Toshitake Yakushiji, Ichiro Manabe, Naoki Mochizuki, Hiroshi Mizuta, and Yuichi Oike. n.d. *The Secreted Protein ANGPTL2 Promotes Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Integrin $\alpha 5 \beta 1$, P38 MAPK, and Matrix Metalloproteinases*.
- Oft, Martin. 2014. 'IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity'. *Cancer Immunology Research* 2(3):194–99. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0214.
- Oike, Yuichi, Yasuhiro Ito, Hiromitsu Maekawa, Tohru Morisada, Yoshiaki Kubota, Masaki Akao, Takashi Urano, Kunio Yasunaga, and Toshio Suda. 2004. 'Angiopietin-Related Growth Factor (AGF) Promotes Angiogenesis'. doi: 10.1182/blood-2003.
- Ostrand-Rosenberg, Suzanne, and Pratima Sinha. 2009. 'MDSCs: Linking Inflammation and Cancer'. *Journal of Immunology* 182(8):4499–4506. doi: 10.4049/jimmunol.0802740.Myeloid-Derived.
- Owczarek, B., A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka. 2019. 'A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals'. *BioMed Research International* 2019. doi: 10.1155/2019/4216060.
- Palucka, A. Karolina, and Lisa M. Coussens. 2016. 'The Basis of Oncoimmunology'. *Cell* 164(6):1233–47.
- Pittet, Mikael J., Olivier Michielin, and Denis Migliorini. 2022. 'Clinical Relevance of Tumour-Associated Macrophages.' *Nature Reviews. Clinical Oncology* 0123456789(Box 1). doi: 10.1038/s41571-022-00620-6.
- Poh, Ashleigh R., and Matthias Ernst. 2018. 'Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside'. *Frontiers in Oncology* 8(MAR).
- Qian, Shan, Man Zhang, Quanlong Chen, Yanying He, Wei Wang, and Zhouyu Wang. 2016. 'IDO as a Drug Target for Cancer Immunotherapy: Recent Developments in IDO Inhibitors Discovery'. *RSC Advances* 6(9):7575–81.
- Quail, Daniela F., and Johanna A. Joyce. 2013. 'Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis'. *Nature Medicine* 19(11):1423–37.
- Ribas, Antoni, and Jedd D. Wolchok. 2018. 'Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade'. *Science* 359(6382):1350–55.

- Ristich, Vladimir, Siyuan Liang, Wei Zhang, Juan Wu, and Anatolij Horuzsko. 2005. 'Tolerization of Dendritic Cells by HLA-G'. *European Journal of Immunology* 35(4):1133–42. doi: 10.1002/eji.200425741.
- Ristich, Vladimir, Wei Zhang, Siyuan Liang, and Anatolij Horuzsko. 2007. 'Mechanisms of Prolongation of Allograft Survival by HLA-G/ILT4-Modified Dendritic Cells'. *Human Immunology* 68(4):264–71. doi: 10.1016/j.humimm.2006.11.008.
- Rodriguez-Abreu, Delvys, Melissa Lynne Johnson, Maen A. Hussein, Manuel Cobo, Anjan Jayantilal Patel, Nevena Milica Secen, Ki Hyeong Lee, Bartomeu Massuti, Sandrine Hiret, James Chih-Hsin Yang, Fabrice Barlesi, Dae Ho Lee, Luis G. Paz-Ares, Robert Wenchen Hsieh, Karen Miller, Namrata Patil, Patrick Twomey, Amy v Kapp, Raymond Meng, and Byoung Chul Cho. 2020. 'Primary Analysis of a Randomized, Double-Blind, Phase II Study of the Anti-TIGIT Antibody Tiragolumab (Tira) plus Atezolizumab (Atezo) versus Placebo plus Atezo as First-Line (1L) Treatment in Patients with PD-L1-Selected NSCLC (CITYSCAPE)'. *Journal of Clinical Oncology* 38(15_suppl):9503. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9503.
- Rosenberg, Steven A. 2014. 'IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer'. *The Journal of Immunology* 192(12):5451–58. doi: 10.4049/jimmunol.1490019.
- Rouas-Freiss, Nathalie, Joel LeMaout, Jérôme Verine, Diana Tronik-Le Roux, Stéphane Culine, Christophe Hennequin, François Desgrandchamps, and Edgardo D. Carosella. 2017. 'Intratumor Heterogeneity of Immune Checkpoints in Primary Renal Cell Cancer: Focus on HLA-G/ILT2/ILT4.' *Oncoimmunology* 6(9):e1342023. doi: 10.1080/2162402X.2017.1342023.
- van Roy, Maarten, Cedric Ververken, Els Beirnaert, Sven Hoefman, Joost Kolkman, Michel Vierboom, Elia Breedveld, Bert 't Hart, Sofie Poelmans, Lieselot Bontinck, Alex Hemeryck, Sandy Jacobs, Judith Baumeister, and Hans Ulrichs. 2015. 'The Preclinical Pharmacology of the High Affinity Anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 Supports Its Clinical Development in Rheumatoid Arthritis'. *Arthritis Research and Therapy* 17(1). doi: 10.1186/s13075-015-0651-0.
- Rudnick, Stephen I., and Gregory P. Adams. 2009. 'Affinity and Avidity in Antibody-Based Tumor Targeting'. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 24(2):155–61. doi: 10.1089/cbr.2009.0627.
- Rudnick, Stephen I., Jianlong Lou, Calvin C. Shaller, Yong Tang, Andres J. P. Klein-Szanto, Louis M. Weiner, James D. Marks, and Gregory P. Adams. 2011. 'Influence of Affinity and Antigen Internalization on the Uptake and Penetration of Anti-HER2 Antibodies in Solid Tumors'. *Cancer Research* 71(6):2250–59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2277.
- Santulli, Gaetano. 2014. 'Angiopoietin-like Proteins: A Comprehensive Look'. *Frontiers in Endocrinology* 5(JAN).
- Sargentini-Maier, Maria Laura, Philip de Decker, Claudia Tersteeg, Jan Canvin, Filip Callewaert, and Hilde de Winter. 2019. 'Clinical Pharmacology of Caplacizumab for the Treatment of Patients with Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura'. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 12(6):537–45.
- Sasaki, Hidefumi, Ayumi Suzuki, Masayuki Shitara, Yu Hikosaka, Katsuhiko Okuda, Satoru Moriyama, Motoki Yano, and Yoshitaka Fujii. 2012. 'Angiopoietin-like Protein ANGPTL2 Gene Expression Is Correlated with Lymph Node Metastasis in Lung Cancer'. *Oncology Letters* 4(6):1325–28. doi: 10.3892/ol.2012.924.

- Schmidt, Michael M., and K. Dane Wittrup. 2009. 'A Modeling Analysis of the Effects of Molecular Size and Binding Affinity on Tumor Targeting'. *Molecular Cancer Therapeutics* 8(10):2861–71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0195.
- Schmitz, Karl R., Atrish Bagchi, Rob C. Roovers, Paul M. P. van Bergen En Henegouwen, and Kathryn M. Ferguson. 2013. 'Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains'. *Structure* 21(7):1214–24. doi: 10.1016/j.str.2013.05.008.
- Schreiber, Robert D., Lloyd J. Old, and Mark J. Smyth. n.d. *Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion*.
- Scully, Marie, Spero R. Cataland, Flora Peyvandi, Paul Coppo, Paul Knöbl, Johanna A. Kremer Hovinga, Ara Metjian, Javier de la Rubia, Katerina Pavenski, Filip Callewaert, Debjit Biswas, Hilde de Winter, and Robert K. Zeldin. 2019. 'Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura'. *New England Journal of Medicine* 380(4):335–46. doi: 10.1056/nejmoa1806311.
- Seidel, Judith A., Atsushi Otsuka, and Kenji Kabashima. 2018. 'Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations'. *Frontiers in Oncology* 8(MAR):1–14. doi: 10.3389/fonc.2018.00086.
- Shao, Hongfang, Li Ma, Feng Jin, Yang Zhou, Minfang Tao, and Yincheng Teng. 2018. 'Immune Inhibitory Receptor LILRB2 Is Critical for the Endometrial Cancer Progression'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 506(1):243–50. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.114.
- Sharma, Padmanee, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A. Wargo, and Antoni Ribas. 2017. 'Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy'. *Cell* 168(4):707–23.
- Shevryev, Daniil, and Valeriy Tereshchenko. 2020. 'Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis'. *Frontiers in Immunology* 10.
- Shiroishi, Mitsunori, Kimiko Kuroki, Toyoyuki Ose, Linda Rasubala, Ikuo Shiratori, Hisashi Arase, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Daisuke Kohda, and Katsumi Maenaka. 2006. 'Efficient Leukocyte Ig-like Receptor Signaling and Crystal Structure of Disulfide-Linked HLA-G Dimer'. *Journal of Biological Chemistry* 281(15):10439–47. doi: 10.1074/jbc.M512305200.
- Shiroishi, Mitsunori, Kimiko Kuroki, Linda Rasubala, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Eiji Kurimoto, Koichi Kato, Daisuke Kohda, and Katsumi Maenaka. 2006. 'Structural Basis for Recognition of the Nonclassical MHC Molecule HLA-G by the Leukocyte Ig-like Receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d)'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(44):16412–17. doi: 10.1073/pnas.0605228103.
- Shiroishi, Mitsunori, Kouhei Tsumoto, Kimie Amano, Yasuo Shirakihara, Marco Colonna, Veronique M. Braud, David S. J. Allan, Azure Makadzange, Sarah Rowland-Jones, Benjamin Willcox, E. Yvonne Jones, P. Anton van der Merwe, Izumi Kumagai, and Katsumi Maenaka. 2003. 'Human Inhibitory Receptors Ig-like Transcript 2 (ILT2) and ILT4 Compete with CD8 for MHC Class I Binding and Bind Preferentially to HLA-G'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(15):8856–61. doi: 10.1073/pnas.1431057100.
- Singh, Latika, Eric S. Muise, Anannya Bhattacharya, Jeff Grein, Sarah Javaid, Peter Stivers, Jun Zhang, Yujie Qu, Barbara Joyce-Shaikh, Andrey Loboda, Chunsheng Zhang, Michael Meehl, Derek Y. Chiang, Sheila H. Ranganath, Michael Rosenzweig, and Philip E. Brandish. 2021. 'ILT3 (LILRB4) Promotes the Immunosuppressive Function of Tumor-Educated Human Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells'. *Molecular Cancer Research* 19(4):702–16. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0622.

- Siu, Lillian L., Ding Wang, John Hilton, Ravit Geva, Drew Rasco, Ruth Perets, Anson K. Abraham, Douglas C. Wilson, Julia F. Markensohn, Jared Lunceford, Leah Suttner, Shabana Siddiqi, Rachel A. Altura, and Corinne Maurice-Dror. 2022. 'First-in-Class Anti-Immunoglobulin-like Transcript 4 Myeloid-Specific Antibody MK-4830 Abrogates a PD-1 Resistance Mechanism in Patients with Advanced Solid Tumors'. *Clinical Cancer Research* 28(1):57–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2160.
- Sleep, Darrell, Jason Cameron, and Leslie R. Evans. 2013. 'Albumin as a Versatile Platform for Drug Half-Life Extension'. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830(12):5526–34.
- Sokolosky, Jonathan T., Michael Dougan, Jessica R. Ingram, Chia Chi M. Ho, Monique J. Kauke, Steven C. Almo, Hidde L. Ploegh, and K. Christopher Garcia. 2016. 'Durable Antitumor Responses to CD47 Blockade Require Adaptive Immune Stimulation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(19):E2646–54. doi: 10.1073/pnas.1604268113.
- Soetens, Eline, Marlies Ballegeer, and Xavier Saelens. 2020. 'An inside Job: Applications of Intracellular Single Domain Antibodies'. *Biomolecules* 10(12):1–30. doi: 10.3390/biom10121663.
- Sterner, Robert C., and Rosalie M. Sterner. 2021. 'CAR-T Cell Therapy: Current Limitations and Potential Strategies'. *Blood Cancer Journal* 11(4). doi: 10.1038/s41408-021-00459-7.
- Styczyński, Jan. 2020. 'A Brief History of Car-t Cells: From Laboratory to the Bedside'. *Acta Haematologica Polonica* 51(1):2–5.
- Sun, Yuping, Jie Liu, Ping Gao, Yunshan Wang, and Chuanyong Liu. 2008. 'Expression of Ig-like Transcript 4 Inhibitory Receptor in Human Non-Small Cell Lung Cancer'. *Chest* 134(4):783–88. doi: 10.1378/chest.07-1100.
- Takeda, Kazuya, and Akira Nakamura. 2017. 'Regulation of Immune and Neural Function via Leukocyte Ig-like Receptors'. *Journal of Biochemistry* 162(2):73–80. doi: 10.1093/jb/mvx036.
- Tarr, Alexander W., Pierre Lafaye, Luke Meredith, Laurence Damier-Piolle, Richard A. Urbanowicz, Annalisa Meola, Jean Luc Jestin, Richard J. P. Brown, Jane A. Mckeating, Felix A. Rey, Jonathan K. Ball, and Thomas Krey. 2013. 'An Alpaca Nanobody Inhibits Hepatitis C Virus Entry and Cell-to-Cell Transmission'. *Hepatology* 58(3):932–39. doi: 10.1002/hep.26430.
- Tartour, Éric, Federico Sandoval, Jean-yves Bonnefoy, and Wolf H. Fridman. 2011. 'Des Cancers Succès Récents'. 833–41.
- Tijink, Bernard M., Toon Laeremans, Marianne Budde, Marijke Stigter-Van Walsum, Torsten Dreier, Hans J. de Haard, C. René Leemans, and Guus A. M. S. van Dongen. 2008. 'Improved Tumor Targeting of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Nanobodies through Albumin Binding: Taking Advantage of Modular Nanobody Technology'. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(8):2288–97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2384.
- Titov, Aleksei, Aygul Valiullina, Ekaterina Zmievskaya, Ekaterina Zaikova, Alexey Petukhov, Regina Miftakhova, Emil Bulatov, and Albert Rizvanov. 2020. 'Advancing CAR T-Cell Therapy for Solid Tumors: Lessons Learned from Lymphoma Treatment'. *Cancers* 12(1):1–22. doi: 10.3390/cancers12010125.
- van der Touw, William, Hui Ming Chen, Ping Ying Pan, and Shu Hsia Chen. 2017. 'LILRB Receptor-Mediated Regulation of Myeloid Cell Maturation and Function'. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 66(8):1079–87.

- Tratar, Ursa Lamprecht, Simon Horvat, and Maja Cemazar. 2018. 'Transgenic Mouse Models in Cancer Research'. *Frontiers in Oncology* 8(JUL).
- Ujike, Azusa, Kazuhiko Takeda, Akira Nakamura, Shin Ebihara, Kenichi Akiyama, and Toshiyuki Takai. 2002. 'Impaired Dendritic Cell Maturation and Increased TH2 Responses in PIR-B-/- Mice'. *Nature Immunology* 3(6):542–48. doi: 10.1038/ni801.
- Vanini, Frederica, Khosrow Kashfi, and Niharika Nath. 2015. 'The Dual Role of INOS in Cancer'. *Redox Biology* 6:334–43. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009.
- Veglia, Filippo, and Dmitry I. Gabrilovich. 2017. 'Dendritic Cells in Cancer: The Role Revisited'. *Current Opinion in Immunology* 45:43–51.
- Viardot, Andreas, Marie-Elisabeth Goebeler, Georg Hess, Svenja Neumann, Michael Pfreundschuh, Nicole Adrian, Florian Zettl, Martin Libicher, Cyrus Sayehli, Julia Stieglmaier, Alicia Zhang, Dirk Nagorsen, and Ralf C. Bargou. 2016. 'Phase 2 Study of the Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody Blinatumomab in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma'. *Blood* 127(11):1410–16. doi: 10.1182/blood-2015-06-651380.
- Vincke, Cécile, Remy Loris, Dirk Saerens, Sergio Martinez-Rodriguez, Serge Muyldermans, and Katja Conrath. 2009. 'General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold'. *Journal of Biological Chemistry* 284(5):3273–84. doi: 10.1074/jbc.M806889200.
- Vitale, Ilio, Gwenola Manic, Lisa M. Coussens, Guido Kroemer, and Lorenzo Galluzzi. 2019. 'Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment'. *Cell Metabolism* 30(1):36–50.
- Vivier, Eric, Sophie Ugolini, Didier Blaise, Christian Chabannon, and Laurent Brossay. 2012. 'Targeting Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells in Cancer'. *Nature Reviews Immunology* 12(4):239–52.
- Wagtmann, N., S. Rojo, E. Eichler, H. Mohrenweiser, and E. O. Long. 1997. 'A New Human Gene Complex Encoding the Killer Cell Inhibitory Receptors and Related Monocyte/Macrophage Receptors'. *Current Biology* 7:615–18.
- Walk, Eric E., Sophia L. Yohe, Amy Beckman, Andrew Schade, Mary M. Zutter, John Pfeifer, and Anna B. Berry. 2020. 'The Cancer Immunotherapy Biomarker Testing Landscape'. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 144(6):706–24. doi: 10.5858/arpa.2018-0584-CP.
- Walsh, Gary. 2018. 'Biopharmaceutical Benchmarks 2018'. *Nature Biotechnology* 36(12):1136–45. doi: 10.1038/nbt.4305.
- Wang, Qihui, Hao Song, Hao Cheng, Jianxun Qi, Gol Nam, Shuguang Tan, Junzhi Wang, Min Fang, Yi Shi, Zhigang Tian, Xuetao Cao, Zhiqiang An, Jinghua Yan, and George F. Gao. 2019. 'Structures of the Four Ig-like Domain LILRB2 and the Four-Domain LILRB1 and HLA-G1 Complex'. *Cellular and Molecular Immunology* (June):1–10. doi: 10.1038/s41423-019-0258-5.
- Wang, Xiuhui, Zhaohui Hu, Zhe Wang, Yin Cui, and Xu Cui. 2019. 'Angiopoietin-like Protein 2 Is an Important Facilitator of Tumor Proliferation, Metastasis, Angiogenesis and Glycolysis in Osteosarcoma.' *American Journal of Translational Research* 11(10):6341–55.
- Wang, Yi, Kai Conrad, Cecil Johnson, Margaret E. Gatti Mays, and Zihai Li. 2022. *Emerging Strategies in Targeting Tumor - Resident Myeloid Cells for Cancer Immunotherapy*. BioMed Central.
- Weber, Patrick, Cédric Pissis, Rafael Navaza, Ariel E. Mechaly, Frederick Saul, Pedro M. Alzari, and Ahmed Haouz. 2019. 'High-Throughput Crystallization Pipeline at the Crystallography Core Facility of the Institut Pasteur'. *Molecules* 24(24):1–10. doi: 10.3390/molecules24244451.

- Wesolowski, Janusz, Vanina Alzogaray, Jan Reyelt, Mandy Unger, Karla Juarez, Mariela Urrutia, Ana Cauherff, Welbeck Danquah, Björn Rissiek, Felix Scheuplein, Nicole Schwarz, Sahil Adriouch, Olivier Boyer, Michel Seman, Alexei Licea, David v. Serreze, Fernando A. Goldbaum, Friedrich Haag, and Friedrich Koch-Nolte. 2009. 'Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity'. *Medical Microbiology and Immunology* 198(3):157–74.
- Winter, Greg, and Cesar Milstein. 1991. 'Man-Made Antibodies'. 349(January).
- Wittrup, K. Dane, Greg M. Thurber, Michael M. Schmidt, and John J. Rhoden. 2012. 'Practical Theoretic Guidance for the Design of Tumor-Targeting Agents'. Pp. 255–68 in *Methods in Enzymology*. Vol. 503. Academic Press Inc.
- Wu, Kaiyue, Kangjia Lin, Xiaoyan Li, Xiangliang Yuan, Peiqing Xu, Peihua Ni, and Dakang Xu. 2020. 'Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment'. *Frontiers in Immunology* 11(August):1731. doi: 10.3389/fimmu.2020.01731.
- Wu, Mengling, Qianrui Huang, Yao Xie, Xuyi Wu, Hongbo Ma, Yiwen Zhang, and Yong Xia. 2022. 'Improvement of the Anticancer Efficacy of PD-1/PD-L1 Blockade via Combination Therapy and PD-L1 Regulation'. *Journal of Hematology and Oncology* 15(1).
- Wu, Ting, and Yun Dai. 2017. 'Tumor Microenvironment and Therapeutic Response'. *Cancer Letters* 387:61–68.
- Xenaki, Katerina T., Sabrina Oliveira, and Paul M. P. van Bergen en Henegouwen. 2017. 'Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors'. *Frontiers in Immunology* 8(OCT). doi: 10.3389/fimmu.2017.01287.
- Xu, Dan Ping, Wei Wu Shi, Tong Tong Zhang, Hai Yan Lv, Jing Bo Li, Aifen Lin, and Wei Hua Yan. 2016. 'Elevation of HLA-G-Expressing DC-10 Cells in Patients with Gastric Cancer'. *Human Immunology* 77(9):800–804. doi: 10.1016/j.humimm.2016.01.003.
- Xu, Jianliang, Kai Xu, Seolkyoung Jung, Andrea Conte, Jenna Lieberman, Frauke Muecksch, Julio Cesar Cetrulo Lorenzi, Solji Park, Fabian Schmidt, Zijun Wang, Yaoxing Huang, Yang Luo, Manoj S. Nair, Pengfei Wang, Jonathan E. Schulz, Lino Tessarollo, Tatsiana Bylund, Gwo Yu Chuang, Adam S. Olia, Tyler Stephens, I. Ting Teng, Yaroslav Tsybovsky, Tongqing Zhou, Vincent Munster, David D. Ho, Theodora Hatzioannou, Paul D. Bieniasz, Michel C. Nussenzweig, Peter D. Kwong, and Rafael Casellas. 2021. 'Nanobodies from Camelid Mice and Llamas Neutralize SARS-CoV-2 Variants'. *Nature* 595(7866):278–82. doi: 10.1038/s41586-021-03676-z.
- Yang, Longyan, Rongxin Sun, Yan Wang, Ying Fu, Yuanyuan Zhang, Zhaohui Zheng, Zhili Ji, and Dong Zhao. 2019. 'Expression of ANGPTL2 and Its Impact on Papillary Thyroid Cancer'. *Cancer Cell International* 19(1):1–10. doi: 10.1186/s12935-019-0908-9.
- Yang, Zijiang, Aiqin Gao, Wenjing Shi, Jingnan Wang, Xianchao Zhang, Zhengyan Xu, Tingting Xu, Yan Zheng, Yuping Sun, and Fei Yang. 2021. 'ILT4 in Colorectal Cancer Cells Induces Suppressive t Cell Contexture and Disease Progression'. *OncoTargets and Therapy* 14:4239–54. doi: 10.2147/OTT.S290348.
- Yu, Sheng, Gui Xiong, Shimei Zhao, Yanbo Tang, Hua Tang, Kaili Wang, Hongjing Liu, Ke Lan, Xiongjie Bi, and Siliang Duan. 2021. 'Nanobodies Targeting Immune Checkpoint Molecules for Tumor Immunotherapy and Immunoimaging (Review)'. *International Journal of Molecular Medicine* 47(2):444–54.
- Zahavi, David, and Louis Weiner. 2020. 'Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy'. *Antibodies* 9(3):34. doi: 10.3390/antib9030034.

- Zahnd, Christian, Martin Kawe, Michael T. Stumpp, Christine de Pasquale, Rastislav Tamaskovic, Gabriela Nagy-Davidescu, Birgit Dreier, Roger Schibli, H. Kaspar Binz, Robert Waibel, and Andreas Plückthun. 2010. 'Efficient Tumor Targeting with High-Affinity Designed Ankyrin Repeat Proteins: Effects of Affinity and Molecular Size'. *Cancer Research* 70(4):1595–1605. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2724.
- Zhang, Fei, Hudie Wei, Xiaoxiao Wang, Yu Bai, Pilin Wang, Jiawei Wu, Xiaoyong Jiang, Yugang Wang, Haiyan Cai, Ting Xu, and Aiwu Zhou. 2017. 'Structural Basis of a Novel PD-L1 Nanobody for Immune Checkpoint Blockade'. *Cell Discovery* 3:1–12. doi: 10.1038/celldisc.2017.4.
- Zhang, Pei, Xiaosun Guo, Juan Li, Shuwen Yu, Linlin Wang, Guosheng Jiang, Dong Yang, Zhaolong Wei, Nan Zhang, Jie Liu, and Yuping Sun. 2015. 'Immunoglobulin-like Transcript 4 Promotes Tumor Progression and Metastasis and up-Regulates VEGF-C Expression via ERK Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer'. *Oncotarget* 6(15):13550–63. doi: 10.18632/oncotarget.3624.
- Zhang, Pei, Shuwen Yu, Hongyu Li, Chuanyong Liu, Juan Li, Wenli Lin, Aiqin Gao, Linlin Wang, Wei Gao, and Yuping Sun. 2015. 'ILT4 Drives B7-H3 Expression via PI3K/AKT/MTOR Signalling and ILT4/B7-H3 Co-Expression Correlates with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer'. *FEBS Letters* 589(17):2248–56. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.037.
- Zheng, Junke, Masato Umikawa, Changhao Cui, Jiyuan Li, Xiaoli Chen, Chaozheng Zhang, Hoangdinh Hyunh, Xunlei Kang, Robert Silvany, Xuan Wan, Jingxiao Ye, Alberto Puig Cantó, Shu Hsia Chen, Huan You Wang, E. Sally Ward, and Cheng Cheng Zhang. 2012. 'Inhibitory Receptors Bind ANGPTLs and Support Blood Stem Cells and Leukaemia Development'. *Nature* 485(7400):656–60. doi: 10.1038/nature11095.
- Zitvogel, Laurence, Antoine Tesniere, and Guido Kroemer. 2006. 'Cancer despite Immunosurveillance: Immunoselection and Immunosubversion'. *Nature Reviews Immunology* 6(10):715–27.
- Zou, Weiping, Jedd D. Wolchok, and Lieping Chen. 2016. 'PD-L1 (B7-H1) and PD-1 Pathway Blockade for Cancer Therapy: Mechanisms, Response Biomarkers, and Combinations'. *Science Translational Medicine* 8(328). doi: 10.1126/scitranslmed.aad71118.

Abstract

ILT4 (Immunoglobulin-Like Transcript 4) is an immune checkpoint receptor mainly expressed by myeloid immune cells. In cancer context, ILT4 participates in tumor development by maintaining a pro-tumoral immuno-microenvironment and directly promoting tumor cell proliferation. ILT4 interaction with the non-classical MCH class I molecule HLA-G induces an immunosuppressive microenvironment by promoting tolerogenic myeloid cells. Moreover, the ectopic expression of ILT4 has been reported in several solid tumors. The activation of ILT4 by Angiopoietin-like-2 (ANGPTL2) promotes non-small cell lung tumor cell proliferation and inhibits cell apoptosis. Targeting this new immune checkpoint with blocking antibodies is therefore a promising cancer immunotherapy approach. Considering several drawbacks of classical IgG blocking antibodies in solid cancer, we investigated the potential of VHH-based inhibitors. This small monoclonal antibody format, derived from camelid homodimeric antibodies, combine the binding capacities of antibodies to the properties of small molecules. After immunization of an alpaca and phage-display screening, we selected a VHH with high affinity and specificity to ILT4 that inhibits the interaction of the receptor with both ligands. We validated the VHH's biological antagonist activity on tumor cells and monocyte-derived pro-tumoral M2-like macrophages *in vitro*. These results support the potential of this new VHH-based antibody targeting ILT4 in cancer immunotherapy.

Key words: immunotherapy, immune checkpoint, blocking antibody, ILT4, VHH.

Résumé

ILT4 est un point de contrôle immunitaire, principalement exprimé par les cellules myéloïdes du système immunitaire. Dans le contexte cancéreux, ILT4 participe au développement tumoral : il maintient un microenvironnement immunitaire pro-tumoral, et il induit directement la prolifération tumorale. L'activation d'ILT4 par la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I non-classique HLA-G polarise les cellules myéloïdes vers un phénotype immunosuppresseur. De plus, l'expression ectopique d'ILT4 a été rapportée dans plusieurs types de cancers. L'interaction entre l'angiopoiétine-like2 (ANGPTL2) et l'ILT4 promeut la prolifération de cellules de cancer du poumon non à petites cellules et inhibe leur apoptose. Cibler ce nouveau point de contrôle immunitaire par des anticorps bloquants est donc une approche prometteuse en immunothérapie. A la lumière de certaines limitations des anticorps conventionnels bloquants en thérapies des tumeurs solides, nous avons investigué le potentiel d'inhibiteurs basés sur des VHH. Ce petit format d'anticorps, dérivé des anticorps homodimériques de camélidés, allie les propriétés de spécificité des anticorps à celles des petites molécules. Grâce au criblage par phage-display d'une banque immunologique obtenue par immunisation d'un alpaga, nous avons sélectionné un VHH hautement affiné et spécifique pour ILT4, qui inhibe l'interaction entre le récepteur et ses deux ligands. Nous avons confirmé l'effet biologique antagoniste du VHH *in vitro* sur des modèles de cellules tumorales et de macrophages de type M2 pro-tumoraux issus de monocytes. Ces premiers résultats de caractérisation supportent le développement futur de ce nouveau format d'anticorps VHH bloquant ILT4 en immunothérapie antitumorale.

Mots clés : immunothérapie, point de contrôle immunitaire, anticorps bloquant, ILT4, VHH.